

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Michaela Oplová

Aptamery – vazebné a regulační vlastnosti molekul RNA

Aptamers – binding and regulation abilities of RNA molecules

Bakalářská práce

Školitel: doc. RNDr. František Půta, CSc.

Praha, 2013

Ráda bych poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Františku Půtovi, CSc. za cenné rady a odborné vedení této práce. Mé poděkování dále patří přátelům, a to za podporu a povzbuzení. Za významnou podporu při studiu bych zde také ráda poděkovala svým rodičům.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 12. 05. 2013

Michaela Oplová

Abstrakt

Aptamery jsou jednořetězcové ribo- či deoxyribonukleotidy, obvykle délky 20-80 nukleotidů, které prostřednictvím intramolekulárních interakcí zaujímají komplexní trojrozměrné struktury a s vysokou afinitou specificky váží malé cílové molekuly.

Generovány jsou *in vitro* pomocí revoluční technologie SELEX (z angl. systematic evolution of ligand by exponential enrichment) a jejími modifikacemi. Skutečnost, že lze připravit aptamery vážící prakticky jakoukoliv cílovou molekulu, vzbudila značnou pozornost vědecké a medicínské komunity, neboť z aptamerů činí slibné diagnostické a terapeutické nástroje.

Aptamery existují i přirozeně; aptamerové domény byly opakovaně nalezeny jako součást regulačních elementů genové exprese bakterií, kde fungují jako specifické receptory buněčných metabolitů. Doména TPP byla nalezena rovněž u rostlin, hub a zelených řas.

Klíčová slova: DNA, RNA aptamery, riboswitch, thiaminpyrofosfát, regulace genové exprese, SELEX

Abstract

Aptamers are single stranded ribo- or deoxyribonucleotides usually 20 to 80 nucleotides in length that occupy a complex three-dimensional structures by intramolecular interactions and bind to small target molecules with high affinity and specificity.

Aptamers are generated *in vitro* using revolutionary technology SELEX (systematic evolution of ligand by exponential enrichment) and its modifications. They have recently attracted considerable attention of the scientific and medical community because of the fact that is possible to prepare aptamers binding practically any target molecule and this is making aptamers promising as diagnostic and therapeutic tools.

Aptamers also exist naturally; aptamer domains have been found repeatedly as part of the regulatory elements of gene expression in bacteria, where they act as specific receptors for cellular metabolites. Domain TPP has been also found in plants, fungi and green algae.

Key words: DNA, RNA aptamers, riboswitch, thiamine pyrophosphate, regulation of gene expression, SELEX

Obsah

Seznam použitých zkratk.....	1
1. Úvod.....	2
2. Strukturní a vazebné vlastnosti nukleových kyselin	3
3. Strukturní a vazebné vlastnosti přirozeného TPP aptameru.....	7
4. Syntetické aptamery	10
5. SELEX – příprava aptamerů <i>in vitro</i>	13
5.1. Princip technologie	13
5.2. Modifikace knihoven oligonukleotidů.....	16
5.3. Cell-SELEX.....	18
6. Příklady využití aptamerů	20
6.1. Aptamery v diagnostice	20
6.2. Aptamery jako terapeutika.....	22
7. Závěr.....	26
Seznam použité literatury.....	27

Seznam použitých zkratk

ALISA	detekční metoda založená na aptamerech (<i>aptamer-linked immobilized sorbent assay</i>)
BP	místo větvení (<i>branch point</i>)
cDNA	komplementární DNA (<i>complementary DNA</i>)
EEF2	eukaryotní elongační faktor 2
ELISA	imunologická detekční metoda (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
ELONA	diagnostická metoda využívající aptamery (<i>enzyme-linked oligonucleotide assay</i>)
GFP	zelený fluorescenční protein (<i>green fluorescent protein</i>)
mRNA	mediátorová RNA (<i>messenger RNA</i>)
NMR	nukleární magnetická resonance
PCR	polymerázová řetězová reakce (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	polyethylenglykol
pre-mRNA	prekurzor mediátorové RNA
pre-rRNA	prekurzor ribosomální RNA
PSMA	prostaticky specifický membránový antigen
SELEX	technologie generující aptamery (<i>systematic evolution of ligands by exponential enrichment</i>)
siRNA	malá interferující RNA (<i>small interfering RNA</i>)
SRP	signál rozpoznávající částice (<i>signal recognition particle</i>)
TPP	thiaminpyrofosfát
tRNA	transferová RNA
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor
UTR	nepřekládaná oblast (<i>untranslated region</i>)
3'ss	3' sestřihové místo
5'ss	5' sestřihové místo

1. Úvod

Na správném chodu buňky se podílí mnoho biochemických reakcí, které jsou řízeny biologickými katalyzátory. Katalytická funkce v buňkách byla dříve přisuzována pouze proteinům. Dnes je známo, že se na tomto procesu podílejí také molekuly RNA, které kromě přenosu genetické informace vykazují strukturní či katalytické vlastnosti v ribonukleoproteinových komplexech jako je ribosom (Steitz and Moore, 2003), spliceosom (Valadkhan and Manley, 2001; Yean *et al.*, 2000), či signál rozpoznávající částice SRP (Doudna and Batey, 2004). Další schopnost RNA – specificky vázat určitý substrát – byla ukázána na sestřihu prekursoru ribosomální RNA (pre-rRNA) u nálevníka *Tetrahymena*. Sestřih pre-rRNA probíhá bez účasti proteinů, ale jako kofaktor reakce je využíván guanosin, který je specificky vázán molekulou pre-rRNA (Bass and Cech, 1984). Schopnost RNA selektivně rozpoznávat cílové molekuly byla potvrzena *in vitro* selekcí RNA molekul s požadovanými vazebnými vlastnostmi z rozsáhlého množství chemicky syntetizovaných sekvencí. Takto izolované RNA receptory byly nazvány aptamery (Ellington and Szostak, 1990; Tuerk and Gold, 1990).

Aptamery jsou krátké sekvence nukleových kyselin s unikátními vazebnými vlastnostmi, které jsou schopny specificky rozpoznat příslušný ligand. Vazba ligandu pak indukuje sbalení aptameru do stabilní trojrozměrné konformace. Ellington a Szostak selektovali RNA sekvence specificky vážící malé organické molekuly a nazvali je aptamery (Ellington and Szostak, 1990). DNA aptamery byly selektovány o dva roky později (Ellington and Szostak, 1992). Název aptamer se skládá z latinského slova “aptus” – vhodný, pasující a řeckého slova “meros” – částice. Aptamer se totiž adaptivně sbaluje kolem ligandu do příslušné konformace tak, že se ligand stane vnitřní součástí struktury nukleové kyseliny, v čemž tkví vysoká afinita aptamerů vůči cílovým molekulám. Aptamery váží své ligandy pomocí strukturní komplementarity, vrstvení planárních aromatických cyklů, elektrostatických a van der Waalsových interakcí, vodíkových můstků či kombinací těchto interakcí. Efektivní metodu jejich selekce (SELEX) poprvé popsali Tuerk a Gold (Tuerk and Gold, 1990). Popis selekce nastartoval izolaci dalších aptamerů, jejichž cílové ligandy tvoří ionty, malé organické molekuly, peptidy, jednotlivé proteiny, ale dokonce i celé buňky (Wilson and Szostak, 1999).

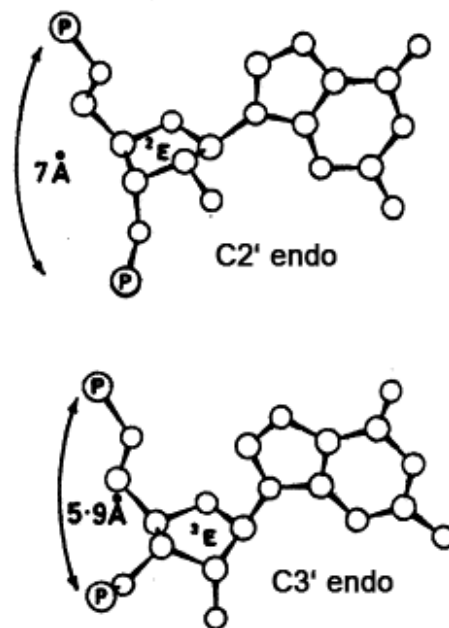
Na základě strukturních studií byly nalezeny i přirozeně se vyskytující aptamerové domény (Mironov *et al.*, 2002; Nahvi *et al.*, 2002). Jedná se o RNA aptamery, které představují receptorovou doménu ligand-dependentního kontrolního elementu zvaného

riboswitch (pro riboswitch není český všeobecně přijatý výraz, dále tedy budu používat název přepínač). Přepínač se obvykle nachází v nekódujících oblastech mRNA, kde konformační změnou reguluje expresi downstream ležících genů v reakci na vazbu malé cílové molekuly, a to bez asistence proteinových faktorů (Barrick and Breaker, 2007). Přepínač je tvořen dvěma základními doménami. Aptamerová doména slouží jako senzor příslušného ligandu. Ta se částečně překrývá s druhou, regulační doménou (zvanou expresní platforma), která se obvykle nachází downstream od aptameru a kontroluje genovou expresi strukturním přeskupením molekuly mRNA (Sudarsan *et al.*, 2003).

2. Strukturní a vazebné vlastnosti nukleových kyselin

Nukleové kyseliny, DNA (deoxyribonuklová kyselina) a RNA (ribonukleová kyselina) jsou negativně nabitě polymery složené ze čtyř základních monomerů, nukleotidů. Každý monomer obsahuje fosfátovou skupinu, pětiuhlíkatou cukernou složku – ribózu/deoxyribózu, jež tvoří cukr-fosfátovou kostru polymeru a dusíkatou bázi. Dusíkaté heterocykly bází s nepolárním charakterem se nachází v centru struktury, která je obklopena polárními fosfosacharidovými řetězci. Každý řetězec nukleové kyseliny má dva konce a je orientován ve směru 5'-3', v tomto směru jsou sekvence nukleových kyselin také zapisovány a čteny. 5' konec představuje fosfát na 5' uhlíku terminálního sacharidu, 3' konec zase 3' OH skupina na 3' uhlíku terminálního sacharidu druhého konce.

Pentacyklus sacharidu netvoří planární strukturu, ale zaujímá položidličkovou konformaci kvůli vznikajícímu sterickému pnutí substituentů jednotlivých uhlíků v kruhu. V nukleových kyselinách se vyskytují dvě konformace sacharidu: C2' endo a C3' endo (Obr.1). C2' endo konformace je typická pro konformaci B-DNA, kdežto konformace C3' endo pro A-DNA a RNA, ve které se 5' a 3' fosfát téže ribózy nachází v bližší vzdálenosti, což se pak odráží v menší vzdálenosti sousedních bází v této konformaci nukleové kyseliny. K cukerné složce je dále připojena příslušná báze N-glykosidickou vazbou, a to buď pyrimidin – cytosin, thymin, uracil, nebo purin – guanin, adenin.



Obr.1: Konformace pentózy v nukleových kyselinách. Převzato z (Premraj *et al.*, 2002).

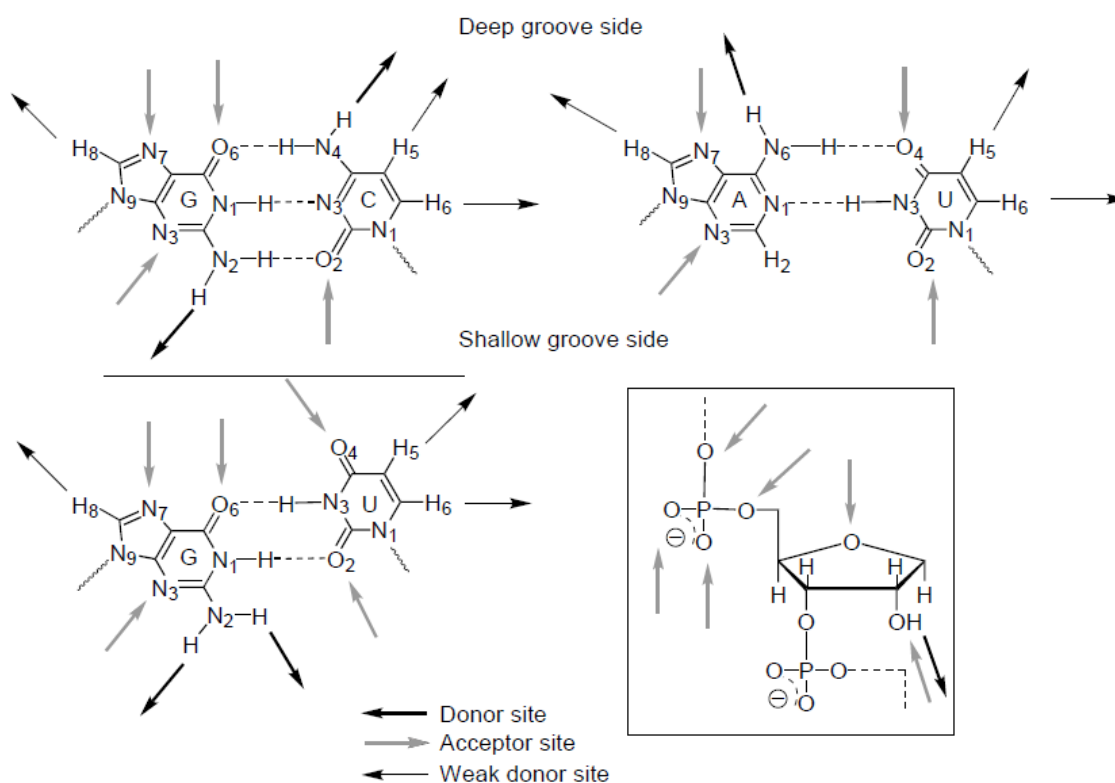
Cytosin, guanin a adenin se vyskytují v obou typech nukleových kyselin. Thymin je exkluzivní bázi DNA, zatímco uracil exkluzivní bázi RNA. RNA se od DNA dále chemicky liší sacharidovou složkou. V RNA se vyskytuje ribóza, která má na C2' navázanou hydroxylovou skupinu, deoxyribóza v DNA nese na C2' pouze vodík. Tyto dvě základní odlišnosti však ve výsledku znamenají značnou variabilitu ve struktuře a funkci těchto molekul (Westhof and Auffinger, 2000).

RNA je ve srovnání s DNA méně stabilní nukleovou kyselinou kvůli 2' OH skupině ribózy, jejímž přičiněním je RNA citlivá vůči zásadité hydrolýze, ale jako reaktivní skupina udává RNA katalytické vlastnosti. Při deprotonaci 2' OH skupiny vzniklý 2' kyslík nukleofilně atakuje nejbližší 3' fosfát za vzniku 2',3' cyklického fosfátu, který následně hydrolyzuje a fosfát pak zůstává na C2' nebo C3' ribózy. Druhý odštěpený produkt nese na svém 5' konci –OH skupinu (Mok and Li, 2008).

DNA se vyskytuje v buňce primárně jako dlouhá dvouřetězcová šroubovice, zatímco RNA je nejčastěji v jednořetězcové formě a může zaujímat mnoho různých konformací. Sekvence nukleotidů v řetězci reprezentuje primární strukturu RNA. Sekundární struktura se vytváří při asociaci komplementárních segmentů molekuly RNA, což je zprostředkováno tvorbou vodíkových můstků mezi komplementárními bázemi. Komplementaritu představuje stejný vazebný motiv akceptorových a donorových míst bází pro tvorbu vodíkových můstků. Z těchto motivů logicky dochází k purin-pyrimidinovému párování – A-T/U nebo G-C známé také jako kanonické Watson-Crickovské (WC) párování bází (Obr.2). Slabé vodíkové můstky tedy zajišťují specifitu párování bází. Mezi A-T/U vznikají dva vodíkové můstky, mezi G-C tři, které tak představují silnější vazbu G-C páru. Spárované úseky se samovolně stáčí do pravotočivé šroubovice, k čemuž významně přispívají hydrofobní interakce mezi sousedními vrstvami párů bází, které celou strukturu stabilizují (π - π interakce). Mezi typické reprezentanty sekundárních struktur RNA se řadí duplexy, jednořetězcové úseky, vlásenky, vybouléniny, vnitřní smyčky a spojení (Obr.3A). Příkladem sekundární struktury může být molekula tRNA, která tvarem připomíná list jetele. Transferová RNA zahrnuje tři vlásenkové struktury (D-, T- a antikodónové rameno), akceptorové rameno a variabilní smyčku (Obr.3B; Batey *et al.*, 1999).

V RNA se kromě klasického Watson-Crickovského párování často nachází i nekanonické WC párování. Hojným zástupcem nekanonického WC páru v RNA je tzv. wobble G·U pár, který je vysoce konzervován například v molekulách tRNA. G·U párování je zprostředkováno dvěma vodíkovými můstky podobně jako u WC párování, ale nabízí odlišná donorová a akceptorová místa vodíkových můstků, jak je patrné z Obr.2. Na párování G·U se

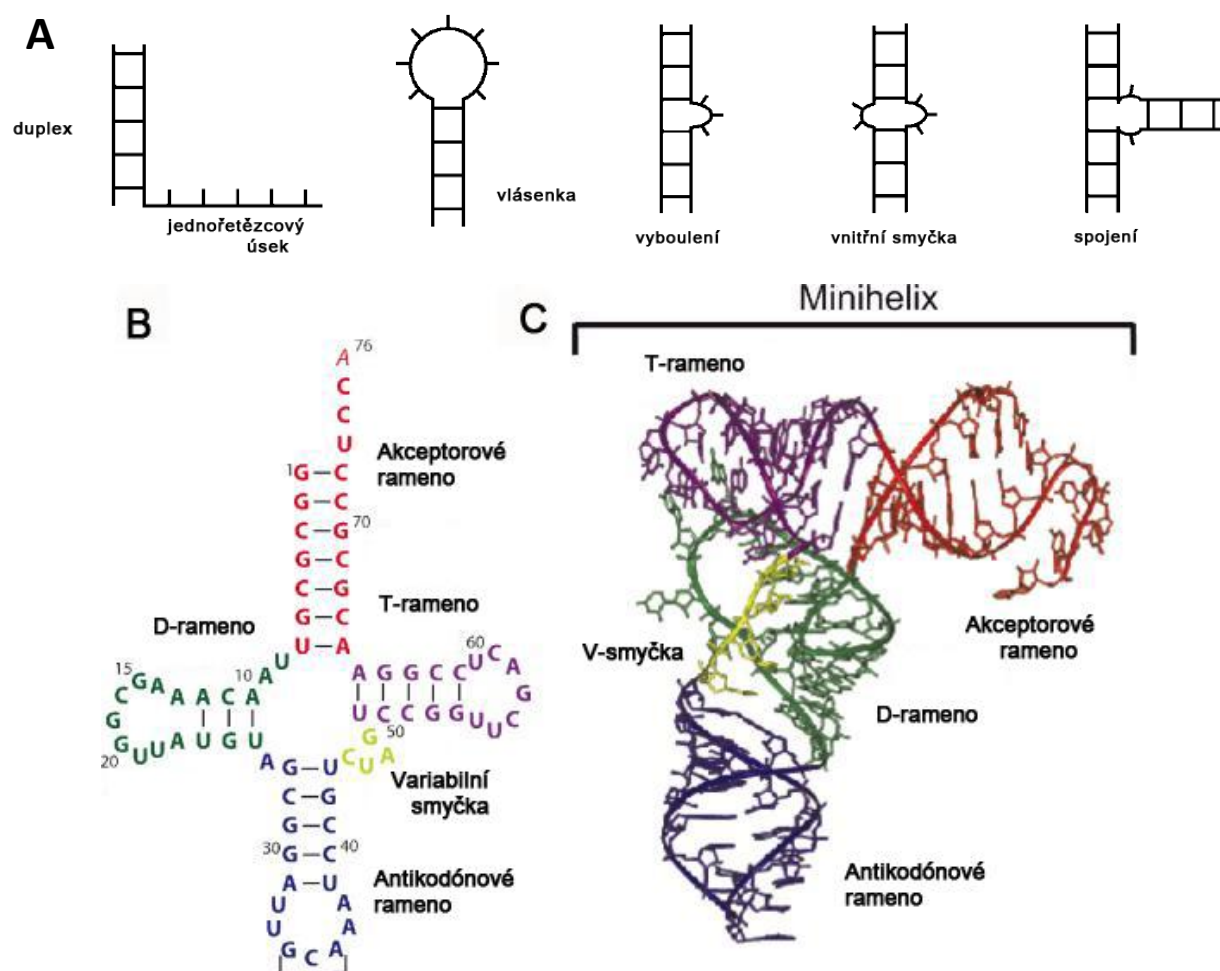
například nepodílí -NH_2 skupina guaninu, a nabízí tak dvě donorová místa vodíkových můstků, což umožňuje vazbu divalentních kationtů, pravděpodobně důležitou pro katalytické vlastnosti RNA. Zařazení G·U páru způsobuje strukturní odchylky ve WC dvoušroubovici RNA. Vznik strukturní rozmanitosti vyplývá z odlišných úhlů mezi C1' uhlíkem ribózy a bázi, která u WC párování odpovídá u všech čtyř nukleotidů 54° , kdežto u G·U je to přibližně 40° pro G a 65° pro U. G·U párování umožňuje specifické rozpoznávání proteinů, nukleových kyselin či jiných ligandů, a také velkou strukturní variabilitu molekul RNA (Varani and McClain, 2000).



Obr.2: Watson-Crickovské páry bází G-C, A-U, nekanonický G·U pár a část cukr-fosfátové kostry. Šipky naznačují možné interakční místa: šedé šipky směřující k atomům představují akceptorová místa vodíkových můstků, černé silnější šipky směřující od atomů představují donorová místa, slabé černé pak slabá donorová místa. 2' OH skupina ribózy nabízí možnost donorového i akceptorového místa vodíkového můstku. Převzato a upraveno z (Westhof and Auffinger, 2000).

Dalším stupněm organizace molekuly RNA je terciární struktura, kdy dochází k asociaci elementů sekundární struktury pomocí Van der Waalsových interakcí, vodíkových můstků, kanonického a nekanonického Watson-Crickovského párování bází. Právě RNA motivy tvořené nekanonickým párováním bází často zprostředkovávají terciární interakce, které utvářejí a stabilizují výslednou 3D strukturu. Ke stabilizaci terciární struktury dále

významně přispívají π - π interakce. Terciární struktura zahrnuje interakce dvou helikálních struktur, jedné helikální s jednořetězcovou oblastí či dvou jednořetězcových oblastí. Jedním z typů terciární struktury je pseudoknot, který vzniká interakcí jednořetězcové oblasti s jednořetězcovou oblastí smyčky. Terciární strukturu lze opět demonstrovat na transferové molekule RNA, kde lze pozorovat význam elektrostatických interakcí mezi vrstvami sousedních párů bází v helixu (Obr.3C). Jejich působením vznikají dva na sebe kolmé sousední helixy. První koaxiální helix tvoří D- a antikodonové rameno, druhý T- a akceptorové rameno. Konečné terciární struktury tvaru písmene L je docíleno terciárními interakcemi mezi konzervovanými nukleotidy smyček T- a D- ramen. Konzervovanost nukleotidů je tedy strukturně důležitou záležitostí - zajišťuje sbalení do stejné komplexní struktury. Pro správné sbalení terciární struktury je také často nutná přítomnost divalentních kationtů. To platí například pro katalytické místo tzv. hammerhead ribozymu, jež zaujímá aktivní konformaci pouze v přítomnosti vysoké koncentrace hořečnatých kationtů (Batey *et al.*, 1999).



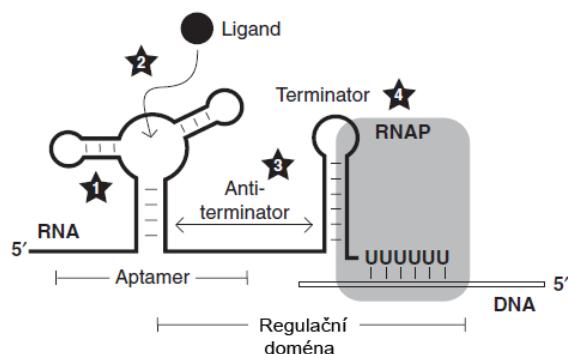
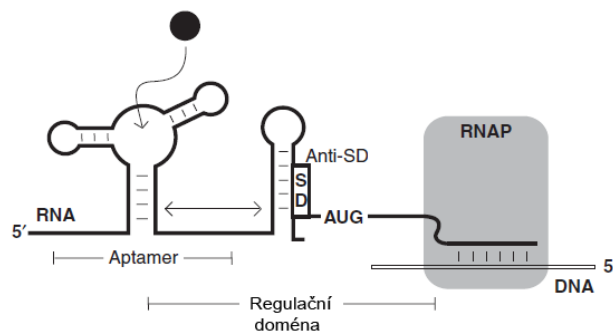
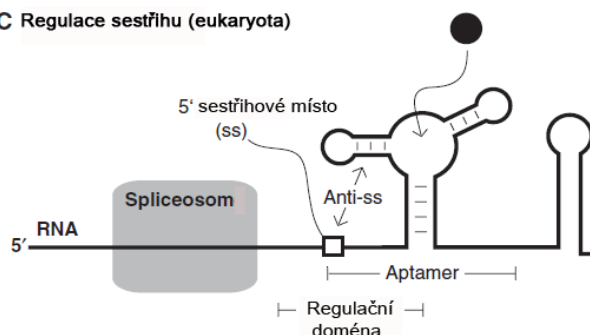
Obr.3: (A) příklady sekundární struktury RNA, převzato a upraveno (Batey *et al.*, 1999), (B) sekundární a (C) terciární struktura molekuly tRNA, převzato a upraveno (Hou, 2010)

3. Strukturní a vazebné vlastnosti přirozeného TPP aptameru

První mechanismus regulace genové exprese pomocí mRNA byl objeven roku 1993 v genu pro aminoacyl-tRNA syntetázu u grampozitivní bakterie *Bacillus subtilis* a dostal název T-box. Ten je schopen vázat nenabitou molekulu tRNA, což vede k vytvoření anti-terminátoru transkripce a pozitivní regulaci exprese genu pro aminoacyl-tRNA syntetázu (Grundy and Henkin, 1993). Aptamery resp. aptamerové domény, důležité pro regulaci genové exprese, byly dále nalezeny v 5' nepřekládané oblasti (5' UTR) mRNA genů, které regulují vitamíny B₂, B₁₂, B₁ při studiu biosyntetických drah těchto vitamínů (Gelfand *et al.*, 1999; Miranda-Ríos *et al.*, 2001; Nou and Kadner, 2000; Rodionov *et al.*, 2002; Stormo and Ji, 2001).

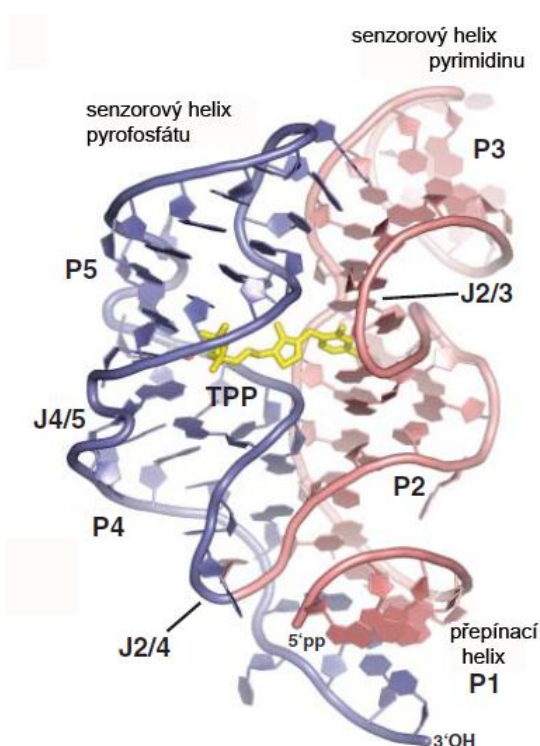
Aptamerová doména je vysoce konzervovaná na rozdíl od druhé, regulační domény přepínače. Na základě této konzervované sekvence a struktury bylo klasifikováno více než 24 tříd přepínačů, ke kterým byl experimentálně přiřazen specifický ligand (Li and Breaker, 2013). Tyto přepínače genové exprese jsou nejčastěji využívány bakteriemi, byly ovšem nalezeny i v genomech eukaryot a archaea. V genomech eukaryot se vyskytuje pouze jediná třída rozeznávající esenciální kofaktor thiaminpyrofosfát (TPP). TPP přepínač se nachází ve všech třech fylogenetických doménách a patří tak k nejrozšířenějším přepínačům vůbec (Barrick and Breaker, 2007; Sudarsan *et al.*, 2003).

Přestože se mechanismus regulace pomocí TPP přepínače v každé doméně liší, konzervovaná aptamerová oblast si napříč doménami zachovává sekvenční a strukturní podobnost. V 5' UTR mRNA genu *tenA* u *Bacillus subtilis* způsobuje vazba ligandu tvorbu terminační vlásenky a předčasně tak ukončuje transkripci (Obr.4A; Mironov *et al.*, 2002). V *Escherichia coli* reguluje TPP přepínač expresi *thiM* genu, který se podílí na biosyntéze thiaminu. V přítomnosti ligandu dochází k inhibici iniciace translace zablokováním vazebného místa pro ribosom (Obr.4B; Winkler *et al.*, 2002). Eukaryotní TPP přepínač nalezený u zástupce hub *Neurospora crassa* se nachází v intronech pre-mRNA třech genů (*NMT1*, *CyPBP37*, *NCU01977.1*) a ovlivňuje jejich alternativní sestřih. Princip regulace sestřihu spočívá v interakci rozvolněného aptameru bez TPP s 5' sestřihovým místem (5' ss), čímž není přístupné pro sestřihový aparát (Obr.4C; Cheah *et al.*, 2007). Další eukaryotní TPP přepínač se nachází u zástupce rostlin *Arabidopsis thaliana*, a to v 3' UTR mRNA upstream od polyA konce genu *thiC*, kde kromě sestřihu kontroluje také úpravy 3' konce mRNA (Wachter *et al.*, 2007).

A Regulace terminace transkripce**B Regulace iniciace translace****C Regulace sestřihu (eukaryota)**

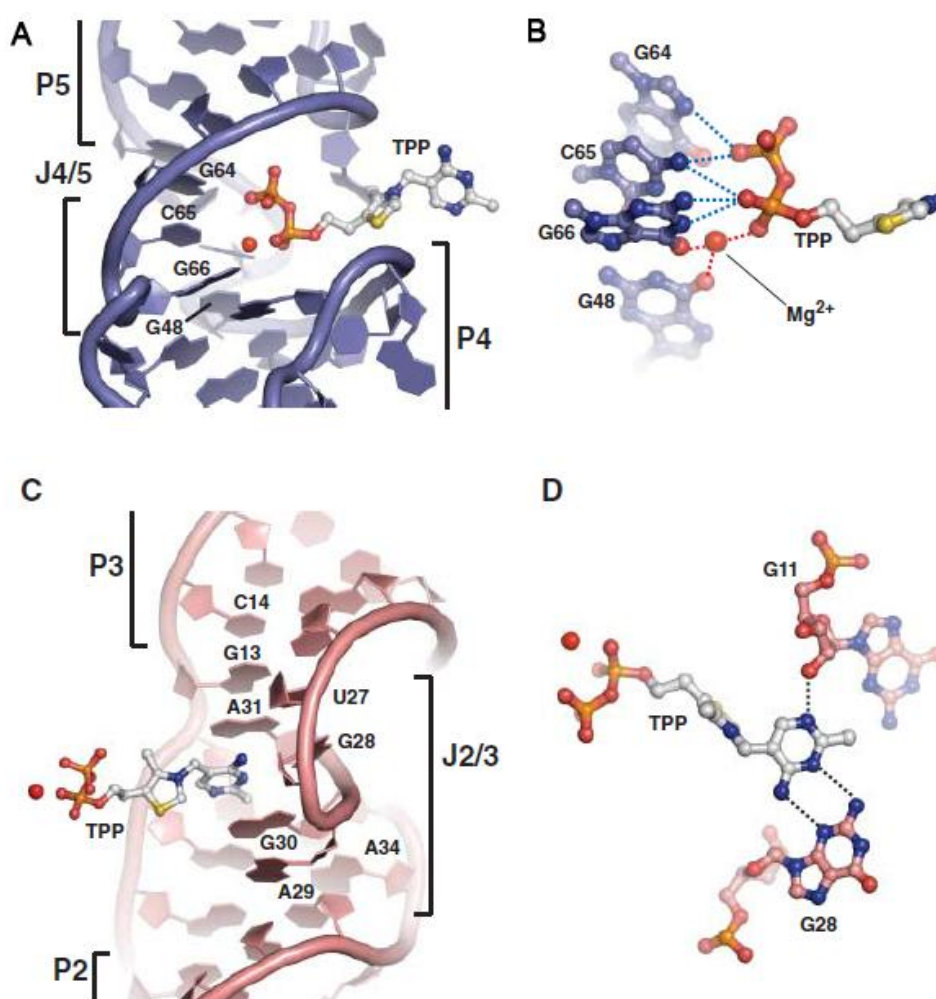
Obr.4: Mechanismy regulace genové exprese pomocí přepínače. (A) regulace terminace transkripce, (B) regulace iniciace translace, (C) regulace sestřihu u eukaryot, čísla představují: (1) sbalení aptameru, (2) vazba ligandu, (3) přeskupení regulační domény, (4) RNA polymeráza. Převzato a upraveno z (Breaker, 2012).

TPP-senzitivní přepínač z *A. thaliana* se skládá z pěti helixů (P1-P5) a připomíná tvar písmene Y (Obr.5). P1 helix spojuje 5' a 3' konec aptameru. Tato helikální struktura je nazývána “přepínací” helix, protože dokáže zaujímat alternativní konformace v závislosti na přítomnosti ligandu, a tak regulovat genovou expresi. Mezi helixy P2 a P3 se nachází vnitřní smyčka J2/3, helixy P4, P5 odděluje smyčka J4/5. Pomocí interakcí mezi vrstvicemi se bázemi vzniká z P2, J2/3, P3 a L3 jeden souosý helix (P2/P3) podobně jako z úseků P4, J4/5, P5 a L5 (P4/P5). Tyto dva souosé helixy vůči sobě zaujímají paralelní postavení a spolu s helixem P1 tvoří spojení tří helixů, které definuje střed aptameru. Oba paralelní helixy se podílí na vazbě TPP a jsou spojeny pomocí ostrého ohybu J2/4. Koaxiální helix P2/P3 je označován jako senzor pyrimidinu a P4/P5 zase jako senzor pyrofosfátu, který specificky rozpoznává.



Obr.5: Struktura TPP přepínače z *Arabidopsis thaliana* po vazbě TPP. Za vazbu TPP jsou zodpovědné dva senzorové helixy. Převzato a upraveno z (Thore et al., 2006).

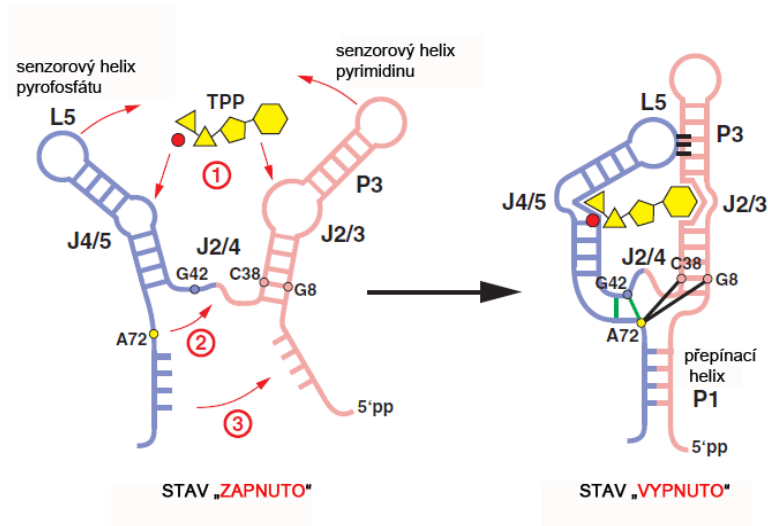
Vazebné místo pro pyrimidin thiaminpyrofosfátu se nachází ve vnitřní smyčce J2/3 v P2/3 helixu. Pyrimidinový kruh je zabudován mezi konzervované báze G30 a A31, s nimiž interaguje pomocí delokalizovaných π -elektronů aromatických heterocyklů (Obr.6C). Na specifické vazbě pyrimidinu se dále podílí vodíkové můstky konzervovaných bází G11, G28 (Obr.6D). Centrální kruh thiazolu interaguje s RNA pouze slabými van der Waalsovými interakcemi. Pyrofosfát je rozpoznáván vnitřní smyčkou J4/5 helixu P4/P5 přímo a koordinovaně (Obr.6A). Přímou vazbu pyrofosfátu zprostředkovávají báze G64, C65 a G66, G66 a G48 dále vytvářejí můstky s hořečnatým kationtem (Obr.6B; Thore *et al.*, 2006). Práce Thora popisuje přítomnost pouze jednoho Mg^{2+} , zatímco Serganov našel při studiu TPP aptameru z *E.coli* dva hořečnaté kationty (Serganov *et al.*, 2006). Kationty Mg^{2+} jsou důležité pro stabilizaci struktury aptameru. V publikaci Ali byla ukázána stabilizace struktury aptameru v přítomnosti pouze hořečnatých kationtů bez TPP, která byla označena za mezistav mezi stavem plně rozvolněným (absence TPP i Mg^{2+}) a plně kompaktním, který nastává v přítomnosti TPP i Mg^{2+} (Ali *et al.*, 2010).



Obr.6: Vazba TPP sensorovými helixy detailně. (A) Vazba pyrofosfátové části oblastí J4/5, (B) báze G64, C65, G66 a G48 vytvářejí vodíkové můstky s kyslíky pyrofosfátu a koordinovaným iontem Mg^{2+} , (C) vazba pyrimidinu oblastí J2/3, pyrimidinový kruh je zabudován mezi báze G30 a A31, s nimiž interaguje pomocí $\pi - \pi$ interakcí, (D) na vazbě pyrimidinu se podílí i nukleotidy G11 a G28, s kterými pyrimidin vytváří vodíkové můstky. Převzato a upraveno z (Thore et al., 2006).

Vazebné místo pro TPP je prostorově rozděleno na dvě odlišná místa, což po vazbě ligandu znamená kromě strukturně lokálních změn i změny globálního rázu. Na základě těchto rysů patří TPP přepínač do obecného typu přepínačů II, typ I je charakterizován pouze jediným vazebným místem, které dokáže po vazbě ligandu vyvolat jen lokální změny konformace (Montange and Batey, 2008).

Stabilitu komplexu ligand-aptamer dále zajišťují terciární interakce, které spojují oba sensorové helixy. Jedná se o kontakt smyčky L5 se slabě konzervovanými bázemi helixu P3 pouze v přítomnosti ligandu a interakce bází ve středu aptameru, kde hraje klíčovou roli konzervovaný purin A72. Tato interakce zodpovídá za vznik P1 helixu, který je při absenci TPP rozrušený a za tvorbu terciární struktury centra aptameru, jež stabilizuje tvorbu ohybu v oblasti J2/4 a umožňuje paralelní uspořádání sensorových helixů (Obr.7; Thore et al., 2006).



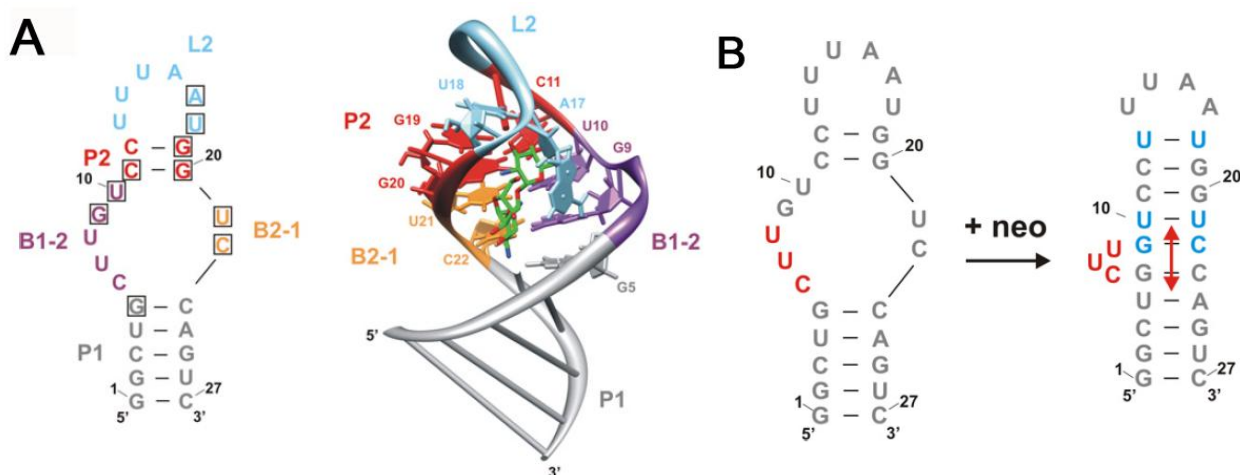
Obr.7: Terciární interakce indukované vazbou TPP – kontakt smyčky L5 s helixem P3 a interakce bází G42, A72, C38, G8 ve středu aptameru, které tvoří centrální spojení třech helixů. Rozvolněný aptamer bez vazby TPP odpovídá zapnutému stavu, sbalený aptamer s TPP představuje vypnutý stav. Převzato a upraveno z (Thore et al., 2006).

4. Syntetické aptamery

Objev přirozených přepínačů s aptamerovou doménou, které regulují genovou expresi na úrovni mRNA, vedl k využití *in vitro* selektovaných RNA aptamerů pro konstrukci uměle vytvořených nástrojů modulace genové exprese (Werstuck and Green, 1998). Pomocí technologie SELEX je prakticky možné selektovat aptamer libovolných vazebných

schopností, ne každý generovaný aptamer však reaguje na vazbu příslušného ligandu takovou konformační změnou, aby mohl být současně využit jako regulační prvek (Wittmann and Suess, 2012).

Na neomycinovém aptameru byla ukázána důležitost rozsáhlých strukturních změn vzniklých vazbou ligandu pro regulační funkci aptameru. Neomycinový aptamer tvoří pouhých 27 nukleotidů a jeho strukturu představují dvě smyčky – vnitřní asymetrická (B1-2 a B2-1) a terminální (L2), které oddělují jen dva GC páry bází (P2; Obr.8A). Obě smyčky aptameru se ukázaly být zásadní pro vazbu ligandu, zatímco pro regulační funkci je důležitá pouze spodní část vnitřní smyčky s důrazem na její asymetrii (Weigand *et al.*, 2011). Pomocí NMR spektroskopie pak byly zaznamenány významné konformační změny aptameru po vazbě neomycinu (Duchardt-Ferner *et al.*, 2010). Vazbou ligandu se rozvolněný aptamer sbaluje do komplexní helikální struktury, z které jsou vytěsněny tři báze vnitřní smyčky (Obr.8B). Vznik stabilní helikální struktury je umožněn díky π - π interakcím planárních heterocyklů bází vrstevících se v helixu nad sebou. Rozsáhlé konformační změny a stabilizace struktury aptameru vyvolané vazbou ligandu nebyly pozorovány u aptamerů bez regulační aktivity (Weigand *et al.*, 2011).



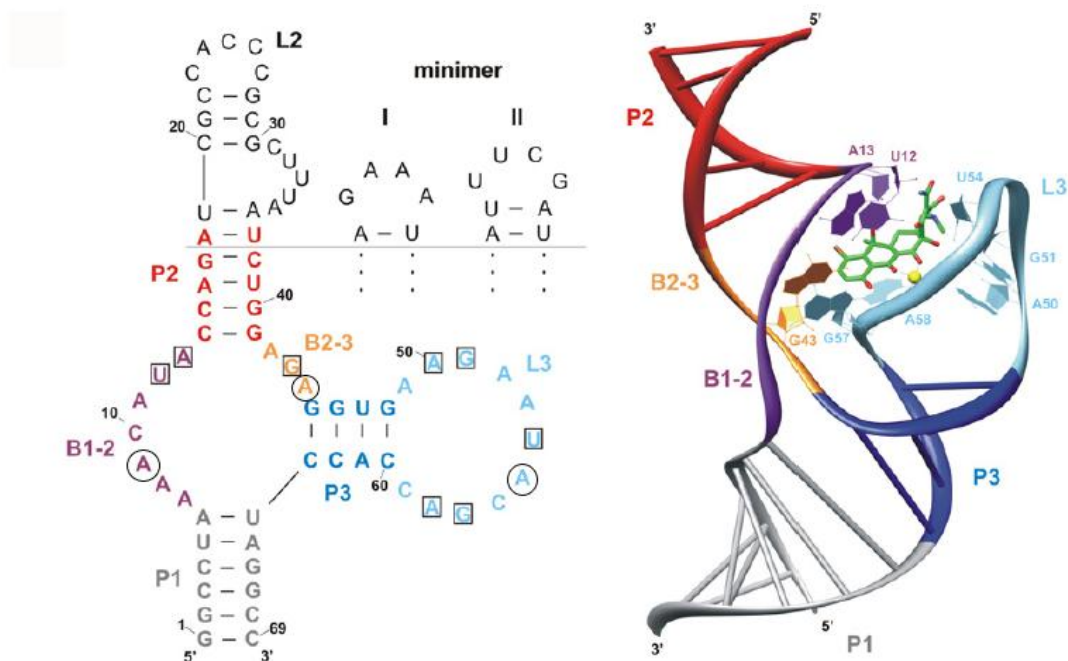
Obr.8: Struktura neomycinového aptameru. (A) 2D a 3D struktura aptameru (helixy P1,P2 a terminální (L2) a vnitřní asymetrická (B1-2, B2-1) smyčka), (B) změna konformace aptameru po vazbě neomycinu - vznikají nové tři páry bází (modře) a tři báze jsou vytěsněny ze stabilní helikální struktury (červeně). Převzato a upraveno z (Wittmann and Suess, 2012).

Werstuck a Green jako první využili selektovaný aptamer v roli regulátoru genové exprese. Vygenerovali aptamer specificky vážící Hoechstovu modř (H33258), která volně vstupuje do buněk. Aptamer pak vložili do 5' UTR LacZ reportérového genu na expresním plazmidu. Takovýto systém transfekovali do savčích buněk a zaznamenali snížení beta-galaktosidázové aktivity v přítomnosti Hoechstovy modři oproti kontrole. Dokázali tak, že lze

pomocí RNA aptamerů regulovat translaci *in vivo* (Werstuck and Green, 1998). Kolektiv pod vedením Suess se touto prací inspiroval a selektoval tetracyklinový aptamer (Tc-aptamer; Obr.9), který po vložení do 5' UTR mRNA genu pro GFP dokázal regulovat iniciaci translace v kvasinkových buňkách *Saccharomyces cerevisiae* (Berens *et al.*, 2001; Suess *et al.*, 2003). Tetracyklinový aptamer inhibuje iniciaci translace, pokud je vložen buď do blízkosti cap struktury mRNA, kdy brání vazbě malé ribozomální podjednotky, nebo těsně před iniciační kodón, kde aptamer zabraňuje malé ribozomální podjednotce skenovat 5' UTR pro rozpoznání start kodónu a sestavení translačního aparátu. Inserce aptameru upstream od start kodónu však reguluje iniciaci translace efektivněji. Zvýšená efektivita regulace byla také prokázána při tandemovém uspořádání Tc-aptamerů v 5' UTR mRNA (Kötter *et al.*, 2009).

U eukaryot lze pomocí uměle připravených aptamerů regulovat genovou expresi také na úrovni alternativního sestřihu. Aptamer je vkládán do blízkosti sekvencí klíčových pro sestřih, za které se považují 5' sestřihové místo (5' ss), místo větvení (angl. branchpoint; BP) a 3' sestřihové místo (3' ss). Pro regulaci sestřihu pomocí RNA aptameru byl využit theofylinový aptamer, který byl vložen do oblasti 3' ss. Tak bylo dosaženo čtyřnásobného snížení efektivity sestřihu *in vitro* v přítomnosti theofylinu (Kim *et al.*, 2005). Aptamer pro theofylin reguluje alternativní sestřih *in vitro* i po inzerci do oblasti BP (Kim *et al.*, 2008). Weigand a Suess použili pro regulaci sestřihu u kvasinek Tc-aptamer, který byl vložen do blízkosti 5' ss. Největší efektivity regulace bylo dosaženo, pokud byla konsensus sekvence 5' sestřihového místa součástí P1 helixu aptameru a současně byla použita nejstabilnější varianta aptameru uzavírající P2 helix GAAA smyčkou (Weigand and Suess, 2007).

Tc-aptamer váže svůj ligand velice pevně, jeho disociační konstanta se pohybuje v subnanomolárních hodnotách (Berens *et al.*, 2001). Struktura Tc-aptameru zahrnuje tři helikální oblasti (P1, P2, P3), dva jednořetězcové spojovací úseky (B1-2, B2-3) a smyčku L3, která uzavírá helix P3 (Obr.9). Pro terciární strukturu Tc-aptameru je klíčová interakce tří nukleotidů (A9, A44, A55), které tvoří základ nepravidelného triplexu v centru aptameru. Za vazbu tetracyklinu zodpovídají obě jednořetězcové oblasti B1-2, B2-3 a nukleotidy smyčky L3 (Xiao *et al.*, 2008). Tetracyklin je polycyklická molekula s jedním aromatickým kruhem a hydrofilními skupinami, která se váže k aptameru pomocí π - π interakcí, vodíkových můstků a Van der Waalsových interakcí. Pro efektivní vazbu je dále nutná přítomnost hořečnatých kationtů. Helikální oblasti P1 a P2 se vazby ligandu neúčastní (Hanson *et al.*, 2005). Vazba tetracyklinu k aptameru probíhá velice rychle ve dvou následných krocích. Nejprve dojde ke kontaktu ligandu s aptamerem (puriny A13, A50), který je následován konformačními změnami (Förster *et al.*, 2012).

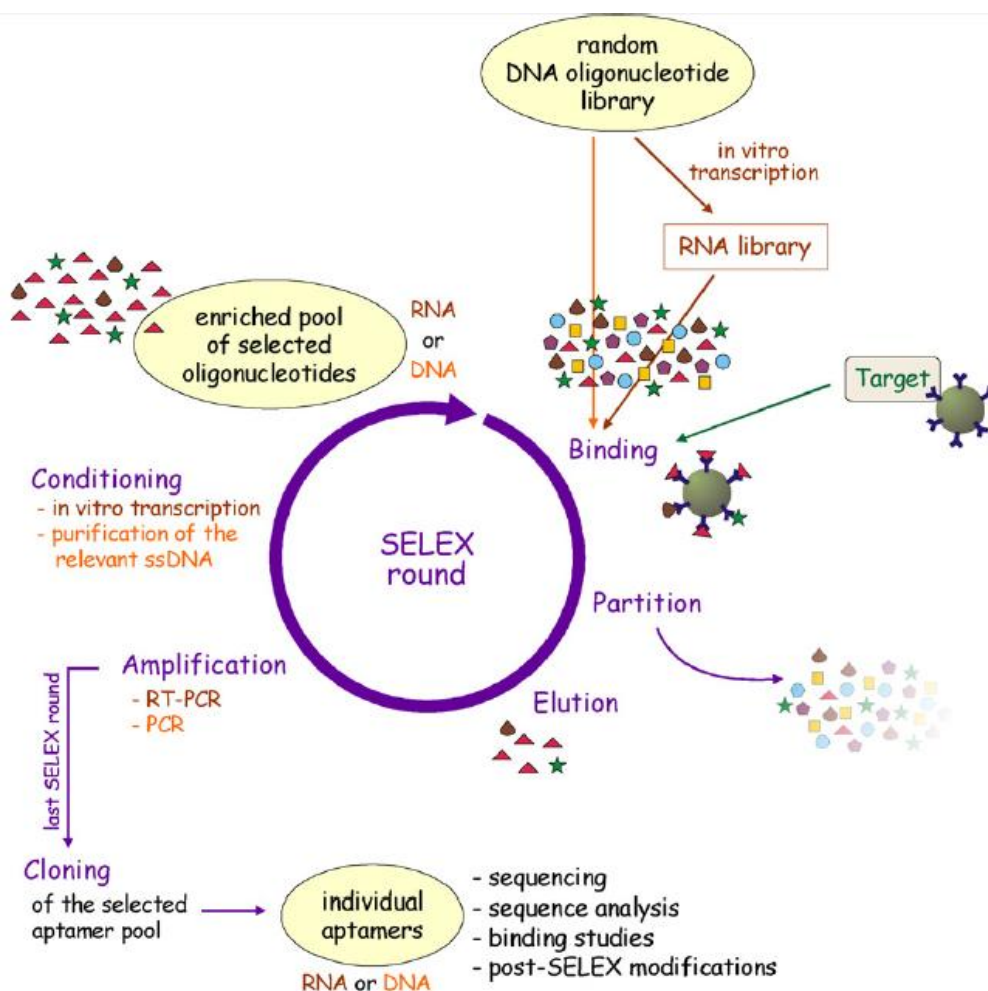


Obr.9: 2D a 3D struktura tetracyklinového aptameru, čtvercem jsou ohraničeny nukleotidy, podílející se na vazbě ligandu, kroužkem jsou nukleotidy klíčové pro tvorbu terciární struktury aptameru. Převzato z (Wittmann and Suess, 2012).

5. SELEX – příprava aptamerů *in vitro*

5.1. Princip technologie

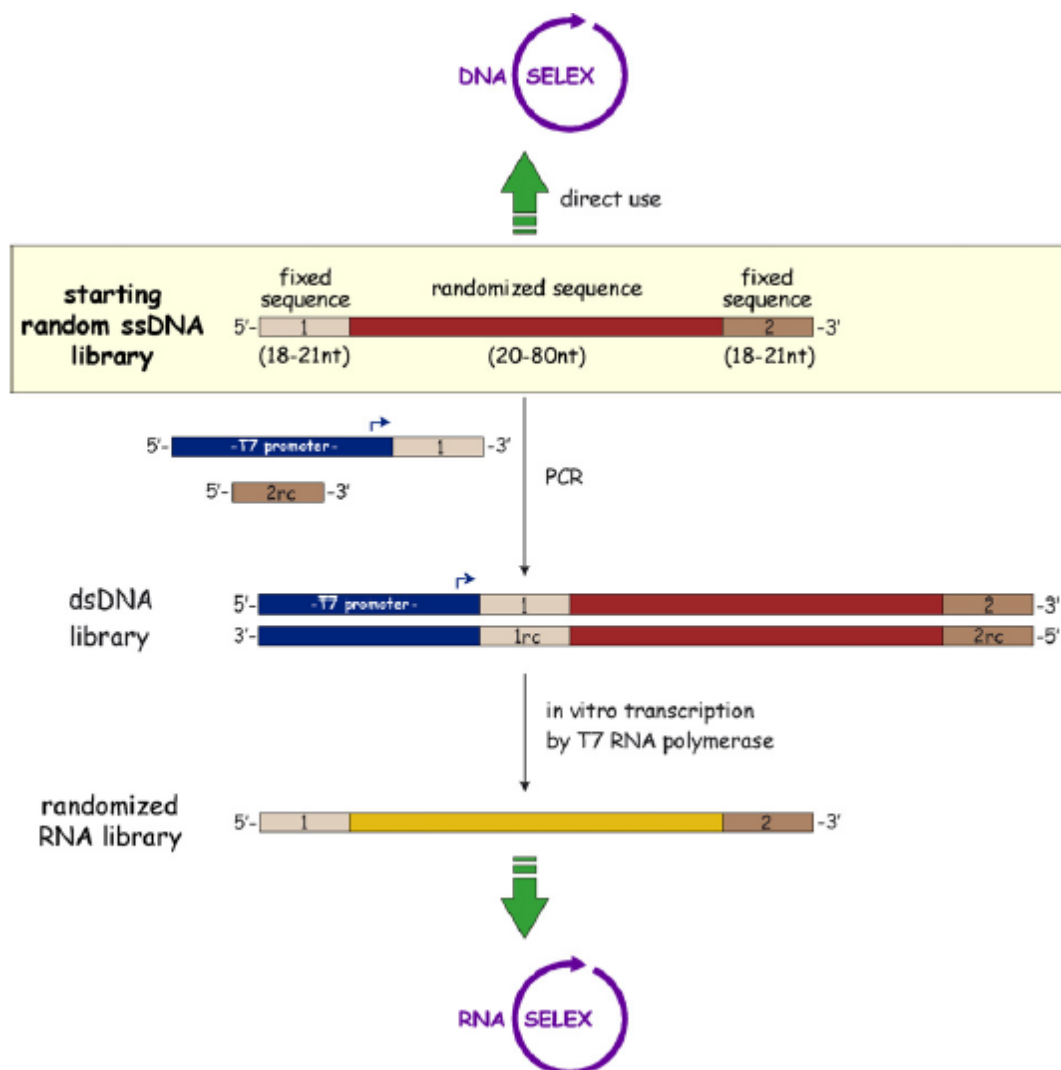
SELEX (angl. Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) označuje revoluční technologii generující oligonukleotidy RNA nebo ssDNA, které díky své trojrozměrné struktuře váží specifickou cílovou molekulu s vysokou afinitou (Stoltenburg *et al.*, 2007). Jedná se o opakující se cykly zahrnující pět základních kroků: navázání aptameru k cílové molekule, oddělení nenavázaných oligonukleotidů, uvolnění navázaných aptamerů, amplifikace izolovaných sekvencí a úpravy PCR produktů na jednořetězcové molekuly pro další cyklus (Obr.10). Technologii vyvinuli Tuerk a Gold a s jejím použitím úspěšně selektovali RNA sekvence interagující s DNA polymerázou bakteriofága T4 (Tuerk and Gold, 1990).



Obr.10: Selekční technologie SELEX. Selekční proces začíná syntézou knihovny DNA oligonukleotidů, která musí být pro selekci RNA aptamerů transformována na RNA knihovnu. Knihovna je dále inkubována s cílovou molekulou, kdy dochází k vazbě aptamer-ligand. Následuje eliminace nenavázaných a uvolnění navázaných oligonukleotidů, které jsou amplifikovány a upravovány pro další cyklus selekce. Poslední cyklus končí amplifikací získaných sekvencí, které jsou poté analyzovány. Převzato z (Stoltenburg et al., 2007).

První krok technologie SELEX představuje chemická syntéza rozsáhlého souboru náhodných sekvencí DNA, čímž vznikne kolem 10^{15} odlišných oligonukleotidů, které tvoří ssDNA knihovnu pro selekci DNA aptamerů. Každý synteticky připravený ssDNA oligonukleotid se skládá z centrální oblasti 20-80 permutovaných nukleotidů, která je z obou stran ohraničena specifickou, 18-21 nukleotidů dlouhou sekvencí pro nasednutí primerů při úvodní a následné amplifikaci selektovaných oligonukleotidů pomocí PCR. Izolace RNA aptamerů vyžaduje před prvním cyklem selekčního procesu transformaci ssDNA knihovny na RNA knihovnu pomocí *in vitro* transkripce. Pro vznik dsDNA knihovny z ssDNA pomocí PCR a její úspěšný převod na RNA jsou vyžadovány dva speciální primery. Sense primer, jehož 3' konec je shodný se specifickou sekvencí na 5' konci ssDNA oligonukleotidu, a na svém 5' konci nese sekvenci promotoru T7 RNA polymerázy. Antisense primer je

komplementární k 3' konci ssDNA oligonukleotidu. Za použití T7 RNA polymerázy z promotoru následně probíhá *in vitro* transkripce a vzniká RNA knihovna (Obr.11). Antisense primer je využit rovněž k primování reverzní transkripce selektovaných molekul RNA na cDNA před následným cyklem amplifikace (Stoltenburg *et al.*, 2007).



Obr.11: Transformace DNA knihovny na RNA knihovnu oligonukleotidů. Každá ssDNA sekvence knihovny se skládá z centrální náhodné sekvence, již ohraničují dvě specifické sekvence pro nasednutí primerů při PCR. Tato knihovna může být rovnou použita pro selekci DNA aptamerů. Izolace RNA aptamerů vyžaduje převod ssDNA knihovny nejprve na dsDNA knihovnu pomocí PCR, k čemuž jsou potřebné dva primery. Sence primer (-T7 promotor-/1) je odvozený od specifické sekvence na 5' konci oligonukleotidu a prodloužen o sekvenci T7 promotoru. Antisense primer (2rc) je reverzně komplementární ke specifické sekvenci na 3' konci oligonukleotidu. Sekvence dsDNA knihovny jsou transkribovány z T7 promotoru T7 RNA polymerázou do RNA knihovny. Převzato z (Stoltenburg *et al.*, 2007).

Další krok selekčního procesu představuje vlastní selekce aptamerů. Připravený soubor oligonukleotidů se v tomto kroku inkubuje s cílovou molekulou a dochází k vazbě ligand-aptamer. Poté je třeba oddělit nenavázané oligonukleotidy od komplexů ligand-aptamer. Tento krok využívá afinitní chromatografie, kdy je cílová molekula zakotvena na sefaróзовé či agaróзовé matrici (Liu and Stormo, 2005; Tombelli *et al.*, 2005). Ultrafiltrace pomocí nitrocelulóзовých filtrů pak představuje metodu, kde probíhá oddělení volných oligonukleotidů bez nutnosti zakotvení cíle (Bianchini *et al.*, 2001). Selektované aptamery jsou následně od ligandu uvolněny denaturací (Stoltenburg *et al.*, 2005) a amplifikovány pomocí PCR. Amplifikaci oligoribonukleotidů pochopitelně předchází jejich reverzní transkripce.

Posledním krokem před zahájením dalšího cyklu selekce je upravování dvouřetězcových PCR produktů. V případě ssDNA aptamerů musí proběhnout oddělení obou řetězců. RNA aptamery vzniknou z PCR produktů transkripcí T7 RNA polymerázou. Selekční proces obvykle vyžaduje 6-20 cyklů, během nichž se komplexní knihovna oligonukleotidů zúží na požadované vysokoafinní sekvence. Poslední kolo selekce končí amplifikačním krokem. Získané sekvence se dále charakterizují pomocí sekvenace. Za tímto účelem je získaný výběr oligonukleotidů klonován do bakteriálních vektorů. Jednotlivé klony aptamerů jsou podrobeny sekvenčním, strukturním a vazebným analýzám pro definici jejich přesných parametrů a vlastností, které jsou důležité pro jejich následné potenciální využití. Získané aptamery jsou často zkracovány na minimální velikost, která ještě zachová vysokou afinitu vůči cílové molekule. Zkrácené sekvence jsou potom typicky 25 až 45 nukleotidů dlouhé (Hicke and Stephens, 2000).

5.2. Modifikace knihoven oligonukleotidů

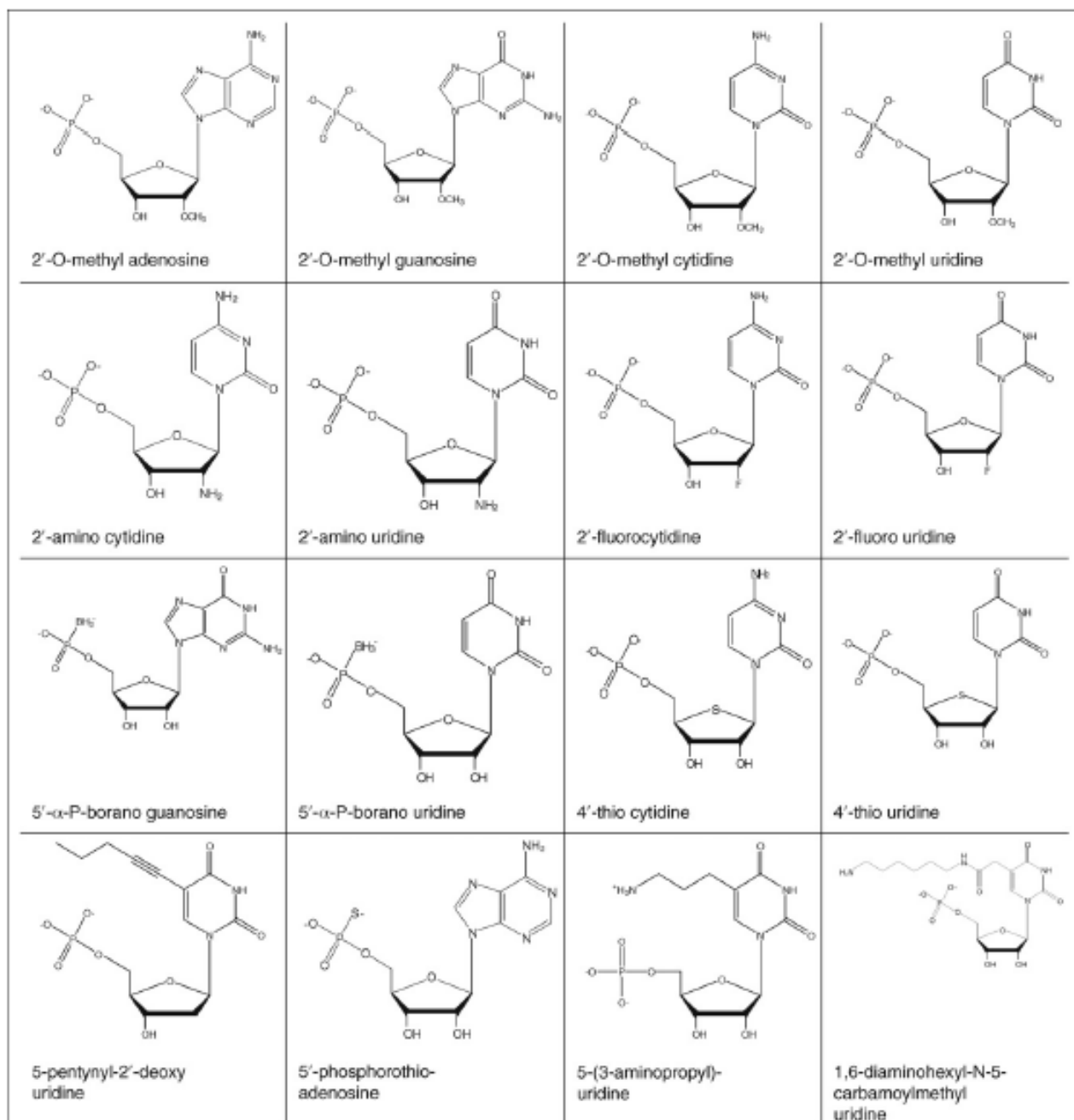
Generované aptamery vykazují *in vivo* podmínkách značnou nestabilitu – jsou degradovány v řádu minut až sekund (Keefe and Cload, 2008). Zejména RNA aptamery jsou velice citlivé k degradacím kvůli své reaktivní 2' OH skupině ribózy, a také kvůli všudypřítomným nukleázám, jež jsou zodpovědné za degradaci nukleových kyselin (Mok and Li, 2008). Pro terapeutické využití aptamerů je však klíčové, aby v podmínkách organismu dokázaly setrvat a účinkovat dostatečně dlouhou dobu. Selektované aptamery proto bývají modifikovány různými funkčními skupinami (Obr.12; Stoltenburg *et al.*, 2007). Post-selekční modifikace stabilizující aptamery mohou ovšem narušit strukturu a sílu vazby aptameru

k cílové molekule, proto jsou připravovány knihovny, které již obsahují modifikované oligonukleotidy. Takový proces se pak nazývá Mod-SELEX (Keefe and Cload, 2008).

Jednu z nejčastějších modifikací představují úpravy 2' OH skupiny ribózy (Keefe and Cload, 2008). 2' OH skupina ribózy pyrimidinů bývá zaměňována za aminoskupinu (Jellinek *et al.*, 1995; Lin *et al.*, 1994), za fluor (Biesecker *et al.*, 1999) nebo za metylovou skupinu, která je navázána přes kyslík 2' OH skupiny (Burmeister *et al.*, 2005). Pro inkorporaci pozmeněných nukleotidů se využívá mutovaná varianta T7 RNA polymerázy, kde je zaměněn tyrosin za fenylalanin v pozici 639 (varianta Y639F). Varianta Y639F T7 RNA polymerázy účinně inkorporuje 2' -fluoro a 2' -amino pyrimidinové nukleotidy (Huang *et al.*, 1997). 2'-O-metyl modifikované nukleotidy zařazuje do nově syntetizovaných oligonukleotidů dvojité mutanta T7 RNA polymerázy - Y639F/H784A (Chelliserrykattil and Ellington, 2004).

Další oligonukleotidové knihovny, z kterých jsou selektovány aptamery rezistentní vůči působení nukleáz, obsahují modifikace cukr-fosfátové kostry. Fosforothioaptamery mají zaměněn jeden fosfátový kyslík za síru, přičemž se nejedná o kyslík podílející se na fosfodiesterové vazbě (Andreola *et al.*, 2000; Jhaveri *et al.*, 1998; King *et al.*, 2002). Je známa i substituce fosfátového kyslíku za boran u guanosinu a uridinu, kterou lze využít v procesu SELEX (Lato *et al.*, 2002). Alternativní místo substituce kyslíku za síru představuje 4'-O ribózy. Kato syntetizoval thiotrifosfáty 4'-thiouridin, 4'-thiocytidin a jejich využitelnost v technologii SELEX doložil úspěšnou selekcí thioRNA aptamerů, vážící lidský α -trombin (Kato *et al.*, 2005).

Nové vlastnosti přisuzují aptamerům modifikace na uhlíku C5 u pyrimidinů či C8 u purinů. Takto modifikované nukleotidy pro zařazení nevyžadují polymerázu se zavedenými mutacemi (Kopylov and Spiridonova, 2000). Masud však využil KOD Dash DNA polymerázu (mix divoké KOD DNA polymerázy a mutované KOD DNA polymerázy, která postrádá 3'-5' exonukleázovou aktivitu) pro konstrukci knihovny oligonukleotidů s modifikovaným deoxyuridinem. Z takovéto knihovny generoval DNA aptamery nesoucí pozitivně nabitou aminoskupinu na uhlíku C5 u pyrimidinů, které byly schopny vázat negativně nabitou cílovou molekulu (Masud *et al.*, 2004). Z DNA knihovny, kde byl thymidin nahrazen modifikovaným 5-(1-pentynyl)-2' deoxy-uridinem, byl selektován aptamer proti proteáze trombinu, který díky přidané hydrofobní skupině dokázal inhibovat proteázovou aktivitu koagulačního faktoru (Latham *et al.*, 1994).

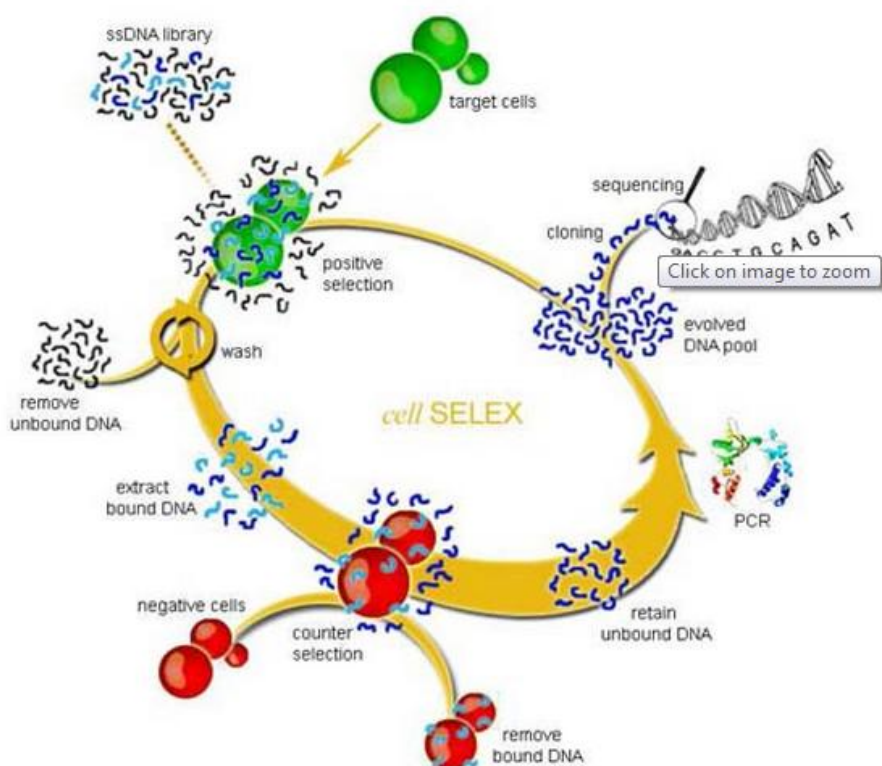


Obr.12: Chemické struktury modifikovaných nukleotidů. Převzato z (Keefe and Clod, 2008).

5.3. Cell-SELEX

Technologie cell-SELEX využívá oproti klasické metodě živé buňky jako cílové molekuly selekce (Obr.13). Lze tak selektovat soubor aptamerů proti specificky se vyskytujícím proteinům na buněčném povrchu (Morris *et al.*, 1998). Klasická metoda pracuje s *in vitro* purifikovanými proteinovými cíli, které často neodpovídají konformacím nativního stavu na buněčném povrchu či postrádají posttranslační modifikace. Tuto nevýhodu

kompenzuje právě metoda selekce vůči živým buňkám (Ye *et al.*, 2012). Další výhodou cell-SELEXu představuje fakt, že není potřeba znát požadovanou cílovou molekulu. Technologie cell-SELEX generuje aptamery proti povrchovým determinantám, které se typicky vyskytují jen na jednom ze dvou typů buněk (např. na rakovinných buňkách ale nikoli na buňkách tkáně, ze které vznikly). Metoda tak selektuje aptamery proti molekulárním determinantům, kterými se obě linie liší. Kromě kroku pozitivní selekce aptamerů je zde zařazen krok tzv. counter selection, ve kterém jsou aptamery získané pozitivní selekcí inkubovány s kontrolní linií buněk, a jsou tak negativně selektovány vůči druhé buněčné linii tj. např. nádorových buněk (Cerchia *et al.*, 2009). Nenavázané sekvence jsou amplifikovány a podstupují další cyklus selekce. Redukce komplexity oligonukleotidové knihovny u metody cell-SELEX většinou vyžaduje více selekčních cyklů než klasická metoda (Cerchia and de Franciscis, 2010).



Obr.13: Technologie cell-SELEX. Převzato z (Fang and Tan, 2010).

Generované aptamery pak slouží jako molekulární sondy, které jsou schopny rozeznat cílovou buněčnou linii, čímž definují cílové buňky na molekulární úrovni. Schopnosti aptamerů charakterizovat a rozpoznávat buněčné linie je využíváno zejména pro diagnostické

a terapeutické účely, a to hlavně ve vývoji léčby rakoviny. Rakovinné buňky mají svůj povrch totiž vybaven specifickými strukturami (biomarkery), kterými se liší od normálních buněk nebo se prokazatelně mění míra jejich exprese na buněčném povrchu. Znalost těchto struktur je klíčová pro časnou diagnózu rakoviny. Pomocí aptamerů generovaných technologií cell-SELEX mohou být identifikovány či detekovány biomarkery rakovinných buněk (Guo *et al.*, 2008; Shangguan *et al.*, 2008). Dále bylo prokázáno, že pomocí metody cell-SELEX lze získat aptamery, které dokáží rozlišit dva vysoce příbuzné fenotypy jednoho druhu tumoru. Autor článku poukazuje na zřejmý potenciál metody cell-SELEX jako molekulárního nástroje časně diagnózy rozvíjejícího se onemocnění a na aplikovatelnost této metody pro rozlišení různých buněčných typů (Cerchia *et al.*, 2009).

6. Příklady využití aptamerů

Aptamery nabízejí beze sporu široký potenciál využití především v klinické diagnostice a terapii, kde jsou považovány za atraktivní, v budoucnu běžně využívané prostředky.

6.1. Aptamery v diagnostice

Jak již bylo zmíněno výše, díky technologii cell-SELEX mohou být aptamery využívány pro identifikaci a detekci biomarkerů vyskytujících se typicky například na rakovinných buňkách, což reprezentuje základní předpoklad časně a úspěšné diagnózy rakoviny. Kombinací metody cell-SELEX a hmotnostní spektrometrie byl identifikován biomarker buněk T-buněčné akutní lymfoblastické leukémie (CCRF-CEM buňky). Nejprve byl selektován aptamer s nejvyšší afinitou k povrchu CCRF-CEM buněk leukémie nazvaný sgc8 aptamer. Následně byl cílový protein aptameru sgc8 analyzován hmotnostní spektrometrií, jež identifikovala transmembránovou protein tyrosin kinázu 7 (PTK7) jako dosud nepublikovaný biomarker tohoto druhu leukémie (Shangguan *et al.*, 2008).

Na aptamery se začíná pohlížet také jako na vážné konkurenty protilátek. Aptamery fungují velice podobně jako protilátky – specificky váží cílové molekuly na základě svých struktur. Oligomery nukleových kyselin však nabízejí řadu výhod ve srovnání s jejich proteinovými analogy (Zhou *et al.*, 2012). Aptamery například specificky rozeznávají i takové cílové molekuly (ionty, malé molekuly, buněčné povrchy), které protilátky nejsou schopny

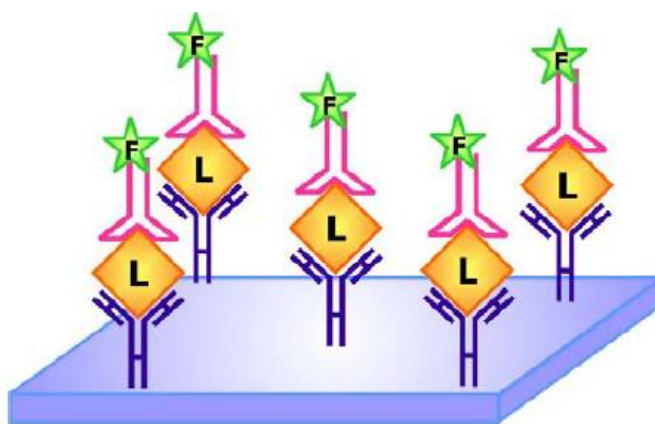
vázat. Aptamery se jako nukleové kyseliny rychle a levně chemicky syntetizují *in vitro*, což zajišťuje větší kontrolu kvality aptamerů na rozdíl od protilátek, které pro svou produkci vyžadují *in vivo* biologický systém. S aptamery lze snadno manipulovat a zaváděné modifikace nukleotidů řeší i problém jejich nestability *in vivo*. Porovnáme-li trvanlivost protilátek a aptamerů, aptamery jsou jasně stabilnější, snadno se skladují a jejich denaturace je reverzibilní proces (Han *et al.*, 2010). Velkou výhodou aptamerů dále představuje jejich malá velikost ve srovnání s protilátkami (průměrně jedna desetina velikosti protilátek), což umožňuje snazší penetraci do tkání a rychlé odstranění z těla. Protilátky mohou dále vyvolat nežádoucí reakce imunitního systému, aptamery však imunogenní účinky nevykazují (Hicke and Stephens, 2000). Oligonukleotidy nukleových kyselin sice nabízejí řadu výhod ve srovnání s protilátkami, ale selekční technologie aptamerů není dostatečně rozšířenou záležitostí, a tak nejsou aptamery zatím běžně využívány (Guthrie *et al.*, 2006).

Vzhledem ke značným výhodám aptamerů vůči protilátkám, začali některé výzkumné skupiny nahrazovat protilátky v imunologicky diagnostických testech. Na protilátkách založená ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) se stala inspirací pro diagnostickou metodu využívající aptamery – ELONA (Enzyme-Linked Oligonucleotide Assay; Drolet *et al.*, 1996).

V technologii ELONA jsou cílové ligandy zakotveny k podkladu pomocí protilátek a detekovány fluorescenčně značeným aptamerem (Obr.14). Popsána byla i detekční metoda sendvičové struktury založená

pouze na aptamerech nazývá ALISA (Aptamer-Linked Immobilized Sorbent Assay), kde aptamery imobilizují i detekují cílovou molekulu

(Vivekananda and Kiel, 2006). Nedávno byla publikována citlivá detekční metoda založená na sendvičovém uspořádání (aptamer-buňka-aptamer) pro detekci lidských rakovinných buněk prsu. Dvojitá detekce sendvičové stavby experimentu zajišťuje vysokou specifitu metody (Zhu *et al.*, 2013).



Obr.14: ELONA (Enzyme-Linked Oligonucleotide Assay) – diagnostická metoda využívající aptamery. Ligand (L) je imobilizován pomocí protilátek (modře), detekován fluorescenčně značeným aptamerem (červeně se zeleným fluoroforem). Převzato z (Mok and Li, 2008).

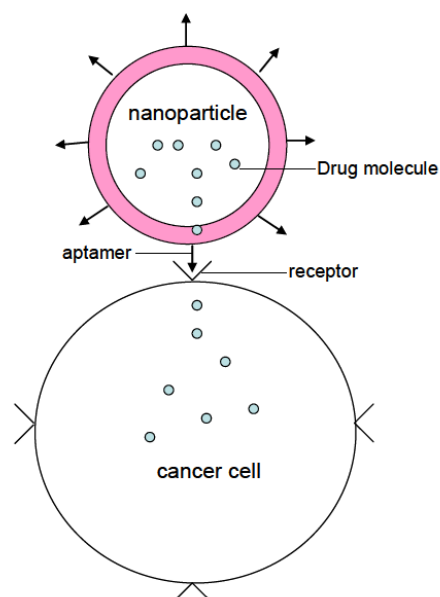
Vlastnosti aptamerů - vysoká specifita a afinita k cílové molekule, rychlý průnik k cílové tkáni a jejich rychlé odbourání z organismu z důvodu malé velikosti - z nich také činí vhodný nástroj pro *in vivo* zobrazovací metody (Hicke and Stephens, 2000). Na myším modelu byla demonstrována účinná vizualizace nádorové tkáně pomocí radioaktivně značeného aptameru rozpoznávající extracelulární matrixový protein tenascin-C. Zvýšená hladina tenascinu-C se typicky vyskytuje ve tkáních, které prochází remodelačními procesy jako je angiogeneze, ale také je pozorována v řadě typů nádorů. U251 glioblastom byl viditelný již za deset minut po aplikaci aptameru, za tři hodiny byl tumor jasně ohraničený a po 18 hodinách působení, kdy už byla většina radioaktivity vyloučena z organismu, byl tumor stále dobře detekovatelný, což indikuje dlouhodobé zadržování aptameru v cílové tkáni (Hicke *et al.*, 2006).

6.2. Aptamery jako terapeutika

Technologie selekce aptamerů byla poprvé popsána roku 1990 (Ellington and Szostak, 1990, Tuerk and Gold, 1990). Již o 14 let později byl klinicky aplikován první aptamer – pegaptanib sodný – komerčně dostupný jako Macugen. Jedná se o 28-nukleotidový RNA aptamer proti vaskulárnímu endoteliálnímu růstovému faktoru (VEGF), který je využíván k léčbě věkem podmíněné makulární degeneraci (Gragoudas *et al.*, 2004). Anti-VEGF aptamer je selektován z modifikované RNA knihovny, obsahující 2'-fluoro pyrimidiny a je k němu kovalentně připojen polyethylenglykol (PEG), jež zvyšuje dobu cirkulace aptameru v plasmě (Ruckman *et al.*, 1998).

Terapeutický záměr Macugenu je založen na inhibici funkce cílového proteinu. Další možnost využití aptamerů jako terapeutika představuje cílené dopravení radionuklidů, chemoterapeutik či jiných terapeutických prostředků k nádorové tkáni. Terapeutikum může být s aptamerem spojeno kovalentně či nekovalentně přes adaptér (Zhou *et al.*, 2012).

Roku 2004 byl popsán první příklad úspěšné aplikace biokonjugátů aptamer-nanočástice (Obr.15) pro specifickou dopravu nanočástice k rakovinným epiteliálním buňkám prostaty (LNCaP buňky), které na svém povrchu vykazují zvýšenou expresi prostaticky-specifického membránového antigenu (PSMA). Rhodaminem značený dextran byl vložen do nanočástice, která byla spojena s fluorescenčně značeným aptamerem proti PSMA. Takto připravené biokonjugáty se byly schopny účinně a specificky vázat na LNCaP buňky exprimující PSMA a již po dvou hodinách inkubace biokonjugátů s buňkami byl dextran detekován uvnitř LNCaP buněk (Farokhzad *et al.*, 2004). Další práce této laboratoře ukazuje úplnou redukci tumoru



Obr.15: Biokonjugát aptamer-nanočástice nesoucí terapeutikum specificky k rakovinným buňkám. Převzato z (Guo *et al.*, 2008).

odvozeného od LNCaP buněk u pěti ze sedmi myší experimentální skupiny po aplikaci biokonjugátu nanočástice-aptamer s docetaxelem jako terapeutickou látkou. Během studie navíc žádná myš z experimentální skupiny neuhynula. Chimérické aptamery by tak díky specifickému rozpoznávání cílových buněk mohly představovat vhodný prostředek snižující nežádoucí efekty cytotoxicity terapeutik na zdravé buňky (Farokhzad *et al.*, 2006).

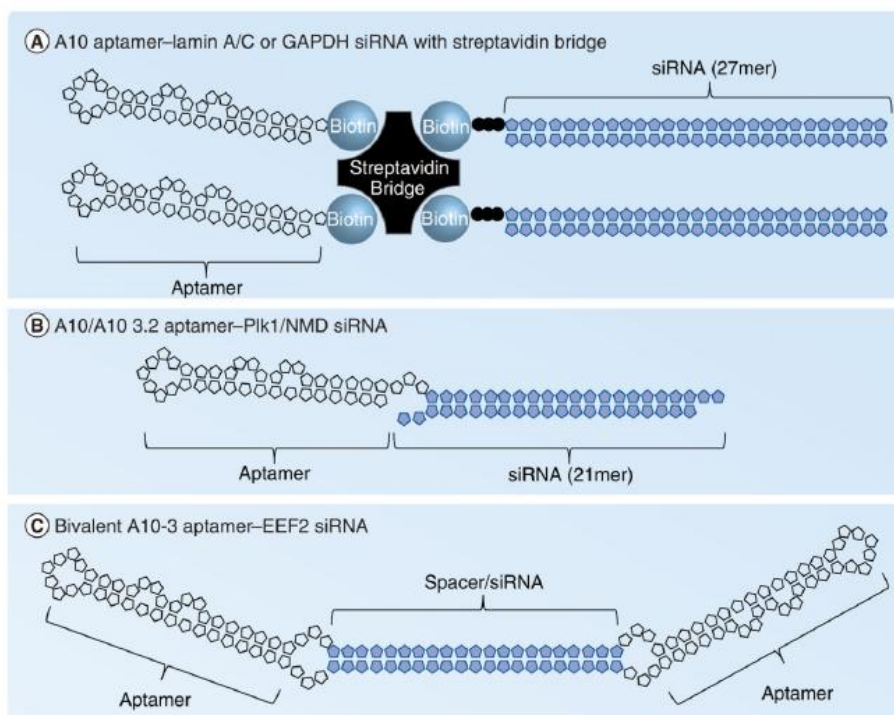
Dalším slibným chimérickým aptamerem je spojení aptameru s malou interferující RNA (siRNA). siRNA je atraktivní terapeutický nástroj, který specificky umlčuje genovou expresi prostřednictvím RNA interference. Pro výsledný efekt působení musí být chiméra aptamer-siRNA specificky dopravena k cílovým buňkám, úspěšně vstoupit do cytoplasmy cílových buněk a následně ji musí rozpoznat RNA interferenční aparát (Dicer, RISC). Konjugáty aptamer-siRNA byly testovány pro možnost využití v léčbě rakoviny prostaty a HIV (Thiel and Giangrande, 2010).

Chu nekovalentně spojil dva biotinylované anti-PSMA aptamery s dvěma biotinylovanými siRNA přes streptavidinový adaptor (Obr.16A). Sekvence siRNA byly komplementární k mRNA kódující lamin A/C nebo GAPDH. Takto připraveným biokonjugátem byla úspěšně snížena hladina exprese příslušných genů v PSMA pozitivních buňkách (LNCaP buňky) *in vitro* (Chu *et al.*, 2006).

Další *in vitro* experiment pracující s chimérou aptamer-siRNA potvrdil úspěšné dopravení siRNA do cílových, PSMA-positivních buněk. siRNA zacílené na geny *BCL-2*

nebo *PLK-1* (Polo-like kinase 1), jejichž zvýšená hladina exprese se vyskytuje u řady lidských nádorů, byla kovalentně připojena k aptameru specificky rozeznávajícímu PSMA na povrchu buněk (Obr.16B). Konjugát byl schopen i v tomto případě specificky rozeznat cílové buňky pomocí aptamerové části chiméry a umlčet projev příslušných genů prostřednictvím siRNA. Injekcí chiméry PSMA-aptamer/Plk1-siRNA do myši s implantátem lidského prostatického nádoru pak byla prokázána schopnost chiméry inhibovat růst nádoru *in vivo* (McNamara *et al.*, 2006).

Vhodnou konstrukcí chiméry aptamer-siRNA lze zvýšit cytotoxický efekt na cílové buňky, jak ukazuje Wullnerova práce. Wullner navrhl dimerickou chiméru skládající se ze dvou anti-PSMA aptamerů, které vzájemně spojuje siRNA komplementární k mRNA eukaryotního elongačního faktoru 2 (EEF2; Obr.16C). Inhibice EEF2 zastavuje syntézu proteinů, jejímž důsledkem je indukce buněčné smrti. Inkubace této chiméry s prostatickými rakovinnými buňkami, které na svém povrchu exprimují PSMA, prokázala, že za přítomnosti dvou aptamerů v konjugátu se chiméra lépe dostává do buněk a je zaznamenána zvýšená efektivita účinku siRNA (Wullner *et al.*, 2008).



Obr.16: Biokonjugáty aptamer-siRNA. A) nekovalentní spojení aptameru pro PSMA s siRNA pro lamin A/C nebo GAPDH přes streptavidinový adaptér (Chu *et al.*, 2006), B) kovalentní připojení anti-PSMA aptameru k siRNA pro Plk1 (McNamara *et al.*, 2006), C) bivalentní konjugát dvou aptamerů pro PSMA spojených siRNA pro EEF2 (Wullner *et al.*, 2008), převzato z (Thiel and Giangrande, 2010)

Chimérický aptamer byl také využit pro inhibici replikace viru HIV. Generovaný aptamer proti obalovému glykoproteinu gp120, byl připojen k siRNA vůči mRNA *tat* a *rev* genů, regulující replikaci viru. Glykoprotein gp120 představuje klíčovou strukturu pro vstup viru do buněk, a také se vyskytuje na povrchu buněk, které jsou virem infikovány (Zhou *et al.*, 2008). Samotný aptamer proti gp120 vykazuje neutralizační účinky, kdy vazbou na obalový glykoprotein gp120 zabraňuje vstupu viru do buněk, čímž snižuje infektivitu viru (Khati *et al.*, 2003). Konjugát anti-gp120 aptamer s anti-*tat/rev* siRNA pak kromě neutralizace virového glykoproteinu zprostředkovává specifické dopravení siRNA do buněk infikovaných virem HIV. Dvojitý terapeutický efekt se kromě snížené infekivity viru HIV odráží v inhibici replikace viru v T-buňkách (Zhou *et al.*, 2008).

7. Závěr

Aptamery byly objeveny před více než dvaceti lety. Od té doby prošel jejich selekční proces mnohými modifikacemi, které umožňují získat aptamer s požadovanými vazebnými vlastnostmi a funkcí. S objevem přírodních regulačních elementů na úrovni mRNA s aptamerovou doménou se začali *in vitro* selektované aptamery využívat ke konstrukci uměle připravených kontrolních elementů pro regulaci genové exprese *in vivo*. Unikátní vazebné vlastnosti aptamerů a výhody spojené s faktem, že jsou aptamery odvozené od nukleových kyselin nezůstaly dlouho bez povšimnutí a rychle se staly slibným nástrojem diagnostických a terapeutických metod. Nejenže vykazují mnoho výhod oproti protilátkám, kterým by mohly v budoucnu silně konkurovat či je dokonce nahradit, aptamery také nabízejí možnost velice specificky dopravovat terapeutické látky k patologickým buňkám a tkáním, čímž by bylo možné eliminovat cytotoxické účinky terapeutik na zdravé buňky. Přes snahy vědeckých pracovišť optimalizovat aptamery pro jejich aplikované využití, však ve většině zůstávají tyto slibné terapeutické nástroje ve fázi pre-klinických studií či klinického testování.

Seznam použité literatury

- Ali, M., J. Lipfert, S. Seifert, D. Herschlag, and S. Doniach. 2010.** The ligand-free state of the TPP riboswitch: a partially folded RNA structure. *J Mol Biol* **396**:153-165.
- Andreola, M. L., C. Calmels, J. Michel, J. J. Toulmé, and S. Litvak. 2000.** Towards the selection of phosphorothioate aptamers optimizing in vitro selection steps with phosphorothioate nucleotides. *Eur J Biochem* **267**:5032-5040.
- Barrick, J. E., and R. R. Breaker. 2007.** The distributions, mechanisms, and structures of metabolite-binding riboswitches. *Genome Biol* **8**:R239.
- Bass, B. L., and T. R. Cech. 1984.** Specific interaction between the self-splicing RNA of Tetrahymena and its guanosine substrate: implications for biological catalysis by RNA. *Nature* **308**:820-826.
- Batey, R. T., R. P. Rambo, and J. A. Doudna. 1999.** Tertiary Motifs in RNA Structure and Folding. *Angew Chem Int Ed Engl* **38**:2326-2343.
- Berens, C., A. Thain, and R. Schroeder. 2001.** A tetracycline-binding RNA aptamer. *Bioorg Med Chem* **9**:2549-2556.
- Bianchini, M., M. Radrizzani, M. G. Brocardo, G. B. Reyes, C. Gonzalez Solveyra, and T. A. Santa-Coloma. 2001.** Specific oligobodies against ERK-2 that recognize both the native and the denatured state of the protein. *J Immunol Methods* **252**:191-197.
- Biesecker, G., L. Dihel, K. Enney, and R. A. Bendele. 1999.** Derivation of RNA aptamer inhibitors of human complement C5. *Immunopharmacology* **42**:219-230.
- Breaker, R. R. 2012.** Riboswitches and the RNA world. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**.
- Burmeister, P. E., S. D. Lewis, R. F. Silva, J. R. Preiss, L. R. Horwitz, P. S. Pendergrast, T. G. McCauley, J. C. Kurz, D. M. Epstein, C. Wilson, and A. D. Keefe. 2005.** Direct in vitro selection of a 2'-O-methyl aptamer to VEGF. *Chem Biol* **12**:25-33.
- Cerchia, L., and V. de Franciscis. 2010.** Targeting cancer cells with nucleic acid aptamers. *Trends Biotechnol* **28**:517-525.
- Cerchia, L., C. L. Esposito, A. H. Jacobs, B. Tavitian, and V. de Franciscis. 2009.** Differential SELEX in Human Glioma Cell Lines. *Plos One* **4**.
- Cheah, M. T., A. Wachter, N. Sudarsan, and R. R. Breaker. 2007.** Control of alternative RNA splicing and gene expression by eukaryotic riboswitches. *Nature* **447**:497-500.
- Chelliserrykattil, J., and A. D. Ellington. 2004.** Evolution of a T7 RNA polymerase variant that transcribes 2'-O-methyl RNA. *Nat Biotechnol* **22**:1155-1160.
- Chu, T. C., K. Y. Twu, A. D. Ellington, and M. Levy. 2006.** Aptamer mediated siRNA delivery. *Nucleic Acids Res* **34**:e73.
- Doudna, J. A., and R. T. Batey. 2004.** Structural insights into the signal recognition particle. *Annu Rev Biochem* **73**:539-557.
- Drolet, D. W., L. Moon-McDermott, and T. S. Romig. 1996.** An enzyme-linked oligonucleotide assay. *Nat Biotechnol* **14**:1021-1025.
- Duchardt-Ferner, E., J. E. Weigand, O. Ohlenschläger, S. R. Schmidtke, B. Suess, and J. Wöhnert. 2010.** Highly modular structure and ligand binding by conformational capture in a minimalistic riboswitch. *Angew Chem Int Ed Engl* **49**:6216-6219.

- Ellington, A. D., and J. W. Szostak. 1990.** In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* **346**:818-822.
- Ellington, A. D., and J. W. Szostak. 1992.** Selection in vitro of single-stranded DNA molecules that fold into specific ligand-binding structures. *Nature* **355**:850-852.
- Fang, X., and W. Tan. 2010.** Aptamers generated from cell-SELEX for molecular medicine: a chemical biology approach. *Acc Chem Res* **43**:48-57.
- Farokhzad, O. C., J. Cheng, B. A. Teply, I. Sherifi, S. Jon, P. W. Kantoff, J. P. Richie, and R. Langer. 2006.** Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:6315-6320.
- Farokhzad, O. C., S. Jon, A. Khademhosseini, T. N. Tran, D. A. Lavan, and R. Langer. 2004.** Nanoparticle-aptamer bioconjugates: a new approach for targeting prostate cancer cells. *Cancer Res* **64**:7668-7672.
- Förster, U., J. E. Weigand, P. Trojanowski, B. Suess, and J. Wachtveitl. 2012.** Conformational dynamics of the tetracycline-binding aptamer. *Nucleic Acids Res* **40**:1807-1817.
- Gelfand, M., A. Mironov, J. Jomantas, Y. Kozlov, and D. Perumov. 1999.** A conserved RNA structure element involved in the regulation of bacterial riboflavin synthesis genes. *Trends in Genetics* **15**:439-442.
- Gragoudas, E. S., A. P. Adamis, E. T. Cunningham, M. Feinsod, D. R. Guyer, and V. I. S. i. O. N. C. T. Group. 2004.** Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* **351**:2805-2816.
- Grundy, F. J., and T. M. Henkin. 1993.** tRNA as a positive regulator of transcription antitermination in *B. subtilis*. *Cell* **74**:475-482.
- Guo, K. T., G. Ziemer, A. Paul, and H. P. Wendel. 2008.** CELL-SELEX: Novel perspectives of aptamer-based therapeutics. *Int J Mol Sci* **9**:668-678.
- Guthrie, J. W., C. L. Hamula, H. Zhang, and X. C. Le. 2006.** Assays for cytokines using aptamers. *Methods* **38**:324-330.
- Han, K., Z. Q. Liang, and N. D. Zhou. 2010.** Design Strategies for Aptamer-Based Biosensors. *Sensors* **10**:4541-4557.
- Hanson, S., G. Bauer, B. Fink, and B. Suess. 2005.** Molecular analysis of a synthetic tetracycline-binding riboswitch. *RNA* **11**:503-511.
- Hicke, B. J., and A. W. Stephens. 2000.** Escort aptamers: a delivery service for diagnosis and therapy. *J Clin Invest* **106**:923-928.
- Hicke, B. J., A. W. Stephens, T. Gould, Y. F. Chang, C. K. Lynott, J. Heil, S. Borkowski, C. S. Hilger, G. Cook, S. Warren, and P. G. Schmidt. 2006.** Tumor targeting by an aptamer. *J Nucl Med* **47**:668-678.
- Hou, Y. M. 2010.** CCA addition to tRNA: implications for tRNA quality control. *IUBMB Life* **62**:251-260.
- Huang, Y., F. Eckstein, R. Padilla, and R. Sousa. 1997.** Mechanism of ribose 2'-group discrimination by an RNA polymerase. *Biochemistry* **36**:8231-8242.
- Jellinek, D., L. S. Green, C. Bell, C. K. Lynott, N. Gill, C. Vargeese, G. Kirschenheuter, D. P. McGee, P. Abesinghe, and W. A. Pieken. 1995.** Potent 2'-amino-2'-deoxypyrimidine RNA inhibitors of basic fibroblast growth factor. *Biochemistry* **34**:11363-11372.

- Jhaveri, S., B. Olwin, and A. D. Ellington. 1998.** In vitro selection of phosphorothiolated aptamers. *Bioorg Med Chem Lett* **8**:2285-2290.
- Kato, Y., N. Minakawa, Y. Komatsu, H. Kamiya, N. Ogawa, H. Harashima, and A. Matsuda. 2005.** New NTP analogs: the synthesis of 4'-thioUTP and 4'-thioCTP and their utility for SELEX. *Nucleic Acids Res* **33**:2942-2951.
- Keefe, A. D., and S. T. Cload. 2008.** SELEX with modified nucleotides. *Curr Opin Chem Biol* **12**:448-456.
- Khati, M., M. Schüman, J. Ibrahim, Q. Sattentau, S. Gordon, and W. James. 2003.** Neutralization of infectivity of diverse R5 clinical isolates of human immunodeficiency virus type 1 by gp120-binding 2'F-RNA aptamers. *J Virol* **77**:12692-12698.
- Kim, D. S., V. Gusti, K. J. Dery, and R. K. Gaur. 2008.** Ligand-induced sequestering of branchpoint sequence allows conditional control of splicing. *BMC Mol Biol* **9**:23.
- Kim, D. S., V. Gusti, S. G. Pillai, and R. K. Gaur. 2005.** An artificial riboswitch for controlling pre-mRNA splicing. *RNA* **11**:1667-1677.
- King, D. J., S. E. Bassett, X. Li, S. A. Fennewald, N. K. Herzog, B. A. Luxon, R. Shope, and D. G. Gorenstein. 2002.** Combinatorial selection and binding of phosphorothioate aptamers targeting human NF-kappa B RelA(p65) and p50. *Biochemistry* **41**:9696-9706.
- Kopylov, A. M., and V. A. Spiridonova. 2000.** [Combinatorial chemistry of nucleic acids: SELEX]. *Mol Biol (Mosk)* **34**:1097-1113.
- Kötter, P., J. E. Weigand, B. Meyer, K. D. Entian, and B. Suess. 2009.** A fast and efficient translational control system for conditional expression of yeast genes. *Nucleic Acids Res* **37**:e120.
- Latham, J. A., R. Johnson, and J. J. Toole. 1994.** The application of a modified nucleotide in aptamer selection: novel thrombin aptamers containing 5-(1-pentynyl)-2'-deoxyuridine. *Nucleic Acids Res* **22**:2817-2822.
- Lato, S. M., N. D. Ozerova, K. He, Z. Sergueeva, B. R. Shaw, and D. H. Burke. 2002.** Boron-containing aptamers to ATP. *Nucleic Acids Res* **30**:1401-1407.
- Li, S., and R. R. Breaker. 2013.** Eukaryotic TPP riboswitch regulation of alternative splicing involving long-distance base pairing. *Nucleic Acids Res* **41**:3022-3031.
- Lin, Y., Q. Qiu, S. C. Gill, and S. D. Jayasena. 1994.** Modified RNA sequence pools for in vitro selection. *Nucleic Acids Res* **22**:5229-5234.
- Liu, J., and G. D. Stormo. 2005.** Combining SELEX with quantitative assays to rapidly obtain accurate models of protein-DNA interactions. *Nucleic Acids Res* **33**:e141.
- Masud, M. M., M. Kuwahara, H. Ozaki, and H. Sawai. 2004.** Sialyllactose-binding modified DNA aptamer bearing additional functionality by SELEX. *Bioorg Med Chem* **12**:1111-1120.
- McNamara, J. O., E. R. Andrechek, Y. Wang, K. D. Viles, R. E. Rempel, E. Gilboa, B. A. Sullenger, and P. H. Giangrande. 2006.** Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras. *Nat Biotechnol* **24**:1005-1015.
- Miranda-Ríos, J., M. Navarro, and M. Soberón. 2001.** A conserved RNA structure (thi box) is involved in regulation of thiamin biosynthetic gene expression in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:9736-9741.

- Mironov, A. S., I. Gusarov, R. Rafikov, L. E. Lopez, K. Shatalin, R. A. Kreneva, D. A. Perumov, and E. Nudler. 2002.** Sensing small molecules by nascent RNA: a mechanism to control transcription in bacteria. *Cell* **111**:747-756.
- Mok, W., and Y. F. Li. 2008.** Recent Progress in Nucleic Acid Aptamer-Based Biosensors and Bioassays. *Sensors* **8**:7050-7084.
- Montange, R. K., and R. T. Batey. 2008.** Riboswitches: emerging themes in RNA structure and function. *Annu Rev Biophys* **37**:117-133.
- Morris, K. N., K. B. Jensen, C. M. Julin, M. Weil, and L. Gold. 1998.** High affinity ligands from in vitro selection: complex targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:2902-2907.
- Nahvi, A., N. Sudarsan, M. S. Ebert, X. Zou, K. L. Brown, and R. R. Breaker. 2002.** Genetic control by a metabolite binding mRNA. *Chem Biol* **9**:1043.
- Nou, X., and R. J. Kadner. 2000.** Adenosylcobalamin inhibits ribosome binding to btuB RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:7190-7195.
- Premraj, B. J., S. Raja, and N. Yathindra. 2002.** Structural basis for the unusual properties of 2',5' nucleic acids and their complexes with RNA and DNA. *Biophys Chem* **95**:253-272.
- Rodionov, D. A., A. G. Vitreschak, A. A. Mironov, and M. S. Gelfand. 2002.** Comparative genomics of thiamin biosynthesis in procaryotes. New genes and regulatory mechanisms. *J Biol Chem* **277**:48949-48959.
- Ruckman, J., L. S. Green, J. Beeson, S. Waugh, W. L. Gillette, D. D. Henninger, L. Claesson-Welsh, and N. Janjić. 1998.** 2'-Fluoropyrimidine RNA-based aptamers to the 165-amino acid form of vascular endothelial growth factor (VEGF165). Inhibition of receptor binding and VEGF-induced vascular permeability through interactions requiring the exon 7-encoded domain. *J Biol Chem* **273**:20556-20567.
- Serganov, A., A. Polonskaia, A. T. Phan, R. R. Breaker, and D. J. Patel. 2006.** Structural basis for gene regulation by a thiamine pyrophosphate-sensing riboswitch. *Nature* **441**:1167-1171.
- Shangguan, D., Z. Cao, L. Meng, P. Mallikaratchy, K. Sefah, H. Wang, Y. Li, and W. Tan. 2008.** Cell-specific aptamer probes for membrane protein elucidation in cancer cells. *J Proteome Res* **7**:2133-2139.
- Steitz, T. A., and P. B. Moore. 2003.** RNA, the first macromolecular catalyst: the ribosome is a ribozyme. *Trends Biochem Sci* **28**:411-418.
- Stoltenburg, R., C. Reinemann, and B. Strehlitz. 2007.** SELEX--a (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomol Eng* **24**:381-403.
- Stormo, G. D., and Y. Ji. 2001.** Do mRNAs act as direct sensors of small molecules to control their expression? *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:9465-9467.
- Sudarsan, N., J. E. Barrick, and R. R. Breaker. 2003.** Metabolite-binding RNA domains are present in the genes of eukaryotes. *Rna-a Publication of the Rna Society* **9**:644-647.
- Suess, B., S. Hanson, C. Berens, B. Fink, R. Schroeder, and W. Hillen. 2003.** Conditional gene expression by controlling translation with tetracycline-binding aptamers. *Nucleic Acids Res* **31**:1853-1858.
- Thiel, K. W., and P. H. Giangrande. 2010.** Intracellular delivery of RNA-based therapeutics using aptamers. *Ther Deliv* **1**:849-861.

- Thore, S., M. Leibundgut, and N. Ban. 2006.** Structure of the eukaryotic thiamine pyrophosphate riboswitch with its regulatory ligand. *Science* **312**:1208-1211.
- Tombelli, S., M. Minunni, E. Luzi, and M. Mascini. 2005.** Aptamer-based biosensors for the detection of HIV-1 Tat protein. *Bioelectrochemistry* **67**:135-141.
- Tuerk, C., and L. Gold. 1990.** Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* **249**:505-510.
- Valadkhan, S., and J. L. Manley. 2001.** Splicing-related catalysis by protein-free snRNAs. *Nature* **413**:701-707.
- Varani, G., and W. H. McClain. 2000.** The G x U wobble base pair. A fundamental building block of RNA structure crucial to RNA function in diverse biological systems. *EMBO Rep* **1**:18-23.
- Vivekananda, J., and J. L. Kiel. 2006.** Anti-Francisella tularensis DNA aptamers detect tularemia antigen from different subspecies by Aptamer-Linked Immobilized Sorbent Assay. *Lab Invest* **86**:610-618.
- Wachter, A., M. Tunc-Ozdemir, B. C. Grove, P. J. Green, D. K. Shintani, and R. R. Breaker. 2007.** Riboswitch Control of Gene Expression in Plants by Splicing and Alternative 3' End Processing of mRNAs. *The Plant Cell Online* **19**:3437-3450.
- Weigand, J. E., S. R. Schmidtke, T. J. Will, E. Duchardt-Ferner, C. Hammann, J. Wöhnert, and B. Suess. 2011.** Mechanistic insights into an engineered riboswitch: a switching element which confers riboswitch activity. *Nucleic Acids Res* **39**:3363-3372.
- Weigand, J. E., and B. Suess. 2007.** Tetracycline aptamer-controlled regulation of pre-mRNA splicing in yeast. *Nucleic Acids Res* **35**:4179-4185.
- Werstuck, G., and M. R. Green. 1998.** Controlling gene expression in living cells through small molecule-RNA interactions. *Science* **282**:296-298.
- Westhof, E., and P. Auffinger. 2000.** *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2000.
- Wilson, D. S., and J. W. Szostak. 1999.** In vitro selection of functional nucleic acids. *Annual Review of Biochemistry* **68**:611-647.
- Winkler, W., A. Nahvi, and R. R. Breaker. 2002.** Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression. *Nature* **419**:952-956.
- Wittmann, A., and B. Suess. 2012.** Engineered riboswitches: Expanding researchers' toolbox with synthetic RNA regulators. *FEBS Lett* **586**:2076-2083.
- Wullner, U., I. Neef, A. Eller, M. Kleines, M. K. Tur, and S. Barth. 2008.** Cell-specific induction of apoptosis by rationally designed bivalent aptamer-siRNA transcripts silencing eukaryotic elongation factor 2. *Curr Cancer Drug Targets* **8**:554-565.
- Xiao, H., T. E. Edwards, and A. R. Ferré-D'Amaré. 2008.** Structural basis for specific, high-affinity tetracycline binding by an in vitro evolved aptamer and artificial riboswitch. *Chem Biol* **15**:1125-1137.
- Ye, M., J. Hu, M. Peng, J. Liu, H. Liu, X. Zhao, and W. Tan. 2012.** Generating Aptamers by Cell-SELEX for Applications in Molecular Medicine. *Int J Mol Sci* **13**:3341-3353.
- Yean, S. L., G. Wuenschell, J. Termini, and R. J. Lin. 2000.** Metal-ion coordination by U6 small nuclear RNA contributes to catalysis in the spliceosome. *Nature* **408**:881-884.

Zhou, J., M. L. Bobbin, J. C. Burnett, and J. J. Rossi. 2012. Current progress of RNA aptamer-based therapeutics. *Front Genet* **3**:234.

Zhou, J., H. Li, S. Li, J. Zaia, and J. J. Rossi. 2008. Novel dual inhibitory function aptamer-siRNA delivery system for HIV-1 therapy. *Mol Ther* **16**:1481-1489.

Zhu, X., J. Yang, M. Liu, Y. Wu, Z. Shen, and G. Li. 2013. Sensitive detection of human breast cancer cells based on aptamer-cell-aptamer sandwich architecture. *Anal Chim Acta* **764**:59-63.